

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Oktober 2003 (23.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/087294 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03638

(22) Internationales Anmeldedatum:  
8. April 2003 (08.04.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 16 800.8 15. April 2002 (15.04.2002) DE  
102 22 513.3 17. Mai 2002 (17.05.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EP-PENDORF [DE/DE]; Martinistraße 52, 20246 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLOCK, Andreas [DE/DE]; Lokstedter Steindamm 80, 22529 Hamburg (DE).

(74) Anwälte: WEBER-QUITZAU, Martin usw.; Uexküll & Stolberg, Beselerstraße 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

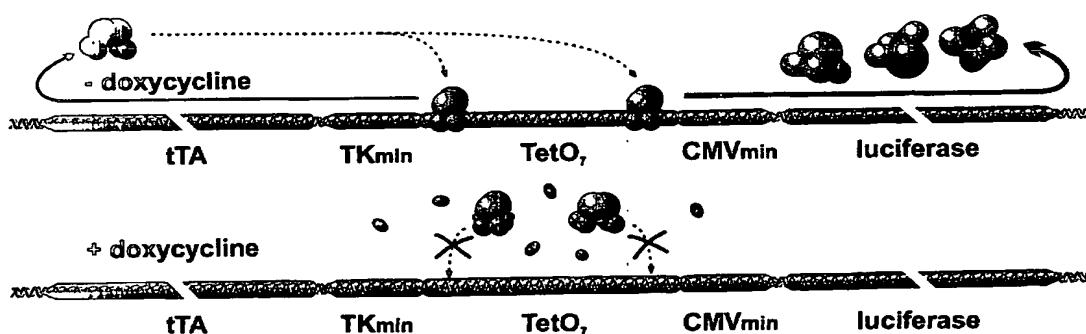
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: RECOMBINING VIRAL VECTORS FOR THE TETRACYCLINE-REGULATED EXPRESSION OF GENES

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE VIRALE VEKTOREN ZUR TETRACYCLINREGULIERBAREN GENEXPRESSION

**Tet-OFF system**



(57) Abstract: The invention relates to recombinant viral vectors which can be suppressed in a highly efficient manner by means of tetracycline or tetracycline derivatives, and the use thereof for expressing genes in eukaryotic cells, particularly within the framework of gene therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

**WO 03/087294 A2**

Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-regulierbaren Genexpression

Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

Bösartige Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen des Menschen. Bei fortgeschrittenen und metastasierten soliden Tumorerkrankungen sind die therapeutischen Möglichkeiten immer noch sehr limitiert und das 5-Jahresüberleben vieler dieser Karzinomerkrankungen beträgt weniger als 10%. Daher stellt die metastasierte

Karzinomerkrankung eine der größten Herausforderungen in der experimentellen Medizin dar. Durch Einschleusen therapeutischer Gene in Tumorzellen eröffneten gentherapeutische Ansätze neue Perspektiven in der Therapie dieser Erkrankungen.

Adenoviren ermöglichen den effizienten Transfer und die Expression therapeutischer Gene in verschiedene Gewebe und Zelllinien. Insbesondere die Weiterentwicklung rekombinanter adenoviraler Vektoren hat die experimentellen Ansätze in der adenoviralen Gentherapie maligner Erkrankungen ermöglicht (K. Kozarsky, Curr Opin Genet Dev 3 (1993) 499-503).

Mit der hohen Effizienz des Gentransfers sind gentherapeutische Ansätze heute häufig durch die Toxizität infolge unkontrollierter Transgenexpression limitiert. Insbesondere bei der adenoviralen vermittelten Expression von Zytokinen wie Interleukin-2, Interleukin-12, Interleukin-18 oder Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  kann es auch bei intratumoraler Gabe der rekombinanten Adenoviren zu unerwarteten erheblichen systemischen Nebenwirkungen kommen. Eine den konstitutiven Promotoren (Cytomegalovirus-Promotor) vergleichbare Genexpression nach erfolgter adenoviraler Infektion mit rekombinanten Vektoren konnte bislang nicht effizient kontrolliert werden.

Gegenwärtig stellt das von M. Gossen et al. entwickelte Tet-System eines der am meisten geeigneten Mittel zur Kontrolle der Genexpression dar (M. Gossen et al., PNAS USA 89 (1992) 5547-5551; M. Gossen et al. Science 268 (1995) 1766-1769). Das Tet-System basiert auf zwei Elementen des E. coli Tet-Operons. Das Tetracyclin-induzierbare Repressorprotein (tetR)

wird mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Dieses tTA Fusionsprotein interagiert mit der heptamerisierten tetO Operatorsequenz, was in der transkriptionellen Aktivierung der flankierenden minimalen Promotoren resultiert. Die Bindung von Tetracyclin und dessen Derivaten an die TetR-Domäne von tTA inhibiert die Wechselwirkung des Fusionsproteins mit dessen Operatorsequenzen, was zur Herunterregulierung der Transgen-Expression führt.

Die Verwendung des ursprünglichen tet-regulierten Genexpressionssystems in rekombinanten adenoviralen Vektoren (TC Harding et al. J. Neurochem. 69 (1997) 2620-2623; TC Harding et al. Nat. Biotechnol. 16 (1998) 553-555) brachte zwei wesentliche Hindernisse mit sich. Die limitierte Verpackungskapazität resultierte in unzureichender Aktivierung des CMV minimalen Promotors durch Verstärkungsinterferenz (S. Rubinovic et al. Gene Therapy 8 (2000) 875-885), und die konstitutionelle Transaktivator-Expression hatte eine mit VP16 zusammenhängende Toxizität zur Folge.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein für die Gentherapie von Tumorerkrankungen geeignetes Genexpressionssystem bereitzustellen, das die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile nicht aufweist. Insbesondere sollen (adeno-)virale Vektoren mit einem hohen Maß an Transgen-Expression bereitgestellt werden, die ferner die Möglichkeit bieten, dass diese Expression im Fall schwerwiegender Nebenwirkungen, die aus der Transgenexpression resultieren, effizient herunterreguliert

werden kann. Ferner sollen die Vektoren ein hohes Maß an Sicherheit bei der Anwendung aufweisen, insbesondere soll die aus dem Stand der Technik bekannte, mit VP16 zusammenhängende Toxizität vermieden werden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen rekombinanten viralen, insbesondere adenoviralen Vektor gelöst, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron<sup>1</sup> - TK<sup>+</sup> - TetO, - CMV<sup>+</sup> - Intron<sup>2</sup> - Transgen

aufweist, wobei

TetO, der heptamerisierte Tetracylin-Operator ist,  
TK<sup>+</sup> der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,  
tTA eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,  
CMV<sup>+</sup> der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und  
Transgen eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,  
Intron<sup>1</sup> eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und  
Intron<sup>2</sup> eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

Für die Konstruktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Adenoviren wurde das Tetracyclin induzierbare Repressor-Protein (tetR) mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Im Vordergrund steht dabei nicht mehr die Inhibition durch Bindung des tetR an das Operon, sondern die Positionierung des VP16 Transaktivators. Entsprechend wurde für die vorliegende Erfindung auch ein heptamerisiertes TetO Operon mit zwei flankierenden Minimalpromotoren verwendet. Dieses System (Fig. 1) führt zur autoregulierten Transaktivator-Expression im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus über einen der Minimalpromotoren. Gleichzeitig wird ein therapeutisches Transgen über den anderen flankierenden Minimalpromoter exprimiert. Doxycyclin und Tetracyclin binden an die tetR-Komponente und eine Änderung der sterischen Konformation führt zu einem Verlust der Bindung des tetR an den Operator. Die Dissoziation des Transaktivators von den Minimalpromotoren hat dann eine Reduktion der Genexpression zur Folge.

Mit den erfindungsgemäßen Vektoren wurde erstmals ein replikationsdefizientes adenovirales System auf Basis eines Vektors erzeugt und charakterisiert, bei dem eine autoregulierte Transaktivator-Expression erfolgt. Dieses System ermöglicht eine sehr strenge Kontrolle der Transgen-Expression durch Zugabe von Doxycyclin in nicht-toxischen Konzentrationen. Die hohe Suppression der Genexpression wurde über einen weiten m.o.i.-Bereich (multiplicity of infection) und in verschiedenen Karzinomzelllinien erreicht.

Der Anteil der Suppression hängt von der verwendeten Konzentration des Antibiotikums ab. Da eine maximale

Suppression der Transgenexpression bereits bei Doxycyclin-Konzentrationen von 2 µg/ml erzielt wurden, sind die erfindungsgemäßen Vektoren bestens zur klinischen Anwendung geeignet.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen genannten Vektor, bei dem das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist, d.h. in der Form

5'-Transgen-Intron<sup>2</sup>-CMV'-TetO,-TK'-Intron<sup>1</sup>-tTA-3'.

Ebenso ist es möglich, daß ausschließlich oder zusätzlich die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.

Soweit die Sequenzelemente 'Intron<sup>1</sup>' und/oder 'Intron<sup>2</sup>' vorhanden sind (d.h. > 0 bp), kann deren Länge im Bereich bis zu etwa 1000 bp unabhängig voneinander variieren und z.B. jeweils bis etwa 750, bis etwa 500 oder bis etwa 250 bp betragen. In diesem Fall werden die Promotoren üblicherweise innerhalb der jeweiligen Intronsequenz liegen.

Gemäß einer weiteren Alternative kann das Insert zwischen 'CMV' und 'Intron<sup>2</sup>' oder zwischen 'Intron<sup>2</sup>' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthalten, wodurch eine weitere Regulationsmöglichkeit geschaffen wird.

Das verwendete Transgen ist eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α) oder Interferon-γ (IFN-γ) kodierende Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise single-chain Interleukin-12. Die Erfindung

betrifft ferner Vektoren, bei dem einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Genes zur Apoptose-Induktion, zur Expression des BAX Genes, zur Expression des FAS-L Genes, eines Suizid-Genes, wie Thymidin-Kinase-oder Cytosin-Deaminase-Gen, oder eines  $\beta$ -Galaktosidase-Genes verwendet wird.

Hinsichtlich des verwendeten Virusrückgrats eignet sich insbesondere ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus, wobei Adenoviren besonders bevorzugt sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Vektor ist das Insert in die E1-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert, alternativ eignen sich auch die E3- und/oder die E4-Region.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Vektor, der zum Beispiel durch homologe Rekombination eines viralen, insbesondere eines adenoviralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist. In diesem Zusammenhang steht "SEQ ID NO:" für die gemäß WIPO-Standard ST.25 verwendete Kennziffer <400>.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz sowie dessen Verwendung zur Herstellung eines oben genannten, erfindungsgemäßen Vektors.

Wie bereits erwähnt eignen sich die Vektoren zur *in vitro*-Genexpression in eukaryoten Zelllinien oder, wenn 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, zur Verwendung in der Gentherapie. Beispielsweise kann 'Transgen' IL-12 oder IL-18 sein, wodurch sich der Vektor zur Gentherapie maligner Erkrankungen eignet. Bei den malignen Erkrankungen handelt es sich insbesondere um einen soliden Tumor.

Bei den zuvor genannten Verwendungen wird die Genexpression mit Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivaten, insbesondere mit Doxycyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert. Soweit vorliegend Doxycyclin erwähnt ist, wird der Fachmann die Übertragbarkeit des erfindungsgemäßen Prinzips auf die oben genannten Tetracyclin-Derivate erkennen.

#### Weitere Vorteile der Erfindung:

Im Vergleich zu einer durch den im Stand der Technik stark verwendeten konstitutiven humanen Zytomegalivirus (HCMV) immediate-early Promotor getriebenen Expression des IL-12-Heterodimers wird bei den im Rahmen der Erfindung entwickelten Konstrukten in einer großen Zahl von Krebszelllinien eine bis zu 4000-fach höhere Zytokin-Sekretion beobachtet. Dieser unerwartete Effekt wird auf das Zusammenspiel aus der Wahl der Promotors und der Verwendung von genetisch erzeugtem und hoch-sekretorischem, einzelkettigem IL-12 zurückgeführt. Die IL-12-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin war überraschenderweise ebenfalls den zuvor bereits veröffentlichten adenovirale infizierten murinen Tumorzellen unter Verwendung des CMV-Promotors zu

Regulierung der Expression des heterodimeren oder einzelkettigen mIL-12 überlegen. Da die Transduktion humaner Tumorzellen im Vergleich zu zuvor berichteten Werten aus präklinischen oder klinischen Versuchen bei den erfindungsgemäßen Konstrukten ebenfalls signifikant höher ist, wird somit vorliegend ein weiterer, äußerst vorteilhafter Effekt erzielt. Durch die Möglichkeit, die adenovirale Dosis der erfindungsgemäßen Vektoren zu reduzieren, lassen sich nämlich Vektor-spezifische Nebeneffekte vermindern, was zu einer höheren Sicherheit in der klinischen Anwendung führt.

Im Hinblick auf die gemäß einer besonderen Ausführungsform genutzte Interleukin-12-Expression (siehe unten) haben die erfindungsgemäßen adenoviralen Vektoren ferner den Vorteil, daß sie alle Voraussetzungen zur erfolgreichen gentherapeutischen Krebsbehandlung erfüllen. So wird durch Expression des einzelkettigen Interleukin-12, das, verglichen mit der allgemein verwendeten heterodimeren Form, eine ähnliche Bioaktivität aufweist, die Bildung von inhibitorischen p40-Homodimeren vermindert, und durch die schnelle Regulation der Genexpression im erfindungsgemäßen 3r-System durch effiziente Sekretion des einzelkettigen Interleukin-12 sichergestellt. Die äußerst effiziente, Doxycyclin-vermittelte Suppression der Expression des bioaktiven, einzelkettigen Interleukin-12 trägt somit zur Sicherheit bei der gentherapeutischen Krebsbehandlung bei.

Das erfindungsgemäße System zeichnet sich ferner dadurch aus, daß eine westliche Standardernährung das sensitive tet-OFF-System nicht beeinflußt wird, so daß mögliche Belastungen der

Nahrung mit Spuren an Tetracyclin oder dessen Derivaten im klinischen Umfeld kein Problem darstellen.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren ist die Anwesenheit von Transaktivatoren vor der Infektion mit den Vektoren nicht erforderlich, wodurch die Toxizität infolge der konstitutiven Expression des Transaktivators sowie eine gegenseitige Beeinflussung oder Störung der Transkription durch Doxycyclin-abhängige, autoregulative Genexpression vermieden wird. Demzufolge stellen die adenoviralen Vektoren der vorliegenden Erfindung ein wesentlich vielseitigeres und unaufwendigeres Hilfsmittel im Vergleich zu den im Stand der Technik bekannten Modellen der konstitutiven Transaktivator-Expression dar.

Ferner ist von Vorteil, daß die Doxycyclin-regulierte Genexpression nach adenoviraler Infektion einer großen Vielzahl nativer Säugerzelllinien oder Gewebe erfolgen kann. Die Autoregulation bewirkt ferner eine Beschränkung der ungewollten Transgen-Expression durch reduzierte Transaktivator-Expression bei Suppression durch Doxycyclin. Gegenüber den im Stand der Technik beschriebenen Ansätzen bieten die erfindungsgemäßen Vektoren den Vorteil, daß in Abwesenheit von Doxycyclin eine sehr hohe Transgen-Expression erreicht wird, während die Suppression der Transgen-Expression durch die Zugabe dieses Antibiotikums nicht beeinträchtigt wird, und bis zu 6000-fache Suppressions-Level erzielt werden.

Die erfindungsgemäßen Konstrukte lassen sich somit in vorteilhafter Weise zu Expression therapeutischer Transgene von bis zu 4,8 kB, einschließlich Apoptose-induzierender

Gene, verwenden und stellen damit ein wichtiges Mittel zur molekularen Therapie maligner Erkrankungen dar.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ferner überraschenderweise festgestellt, daß die erfindungsgemäßen Vektoren eine mindestens 40-fach höhere Sensitivität gegenüber Tetracyclin aufweisen als die Detektionsgrenze in Standard-HPLC-Verfahren. Das erfindungsgemäße System eignet sich somit ferner als sensitiveres Hilfsmittel zum Nachweis sehr geringer Tetracyclinkonzentrationen in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben und ist somit beispielsweise zum Einsatz in der human- und veterinärmedizinischen Diagnostik geeignet (vgl. N. Schultze et al. Nat. Biotechnol. 14 (1996) 499-503). Das Transgen kodiert in diesem Fall für ein Reporterprotein, wie z.B. Luciferase oder ähnliches. Gegenstand der Erfindung ist somit ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben, wie z.B. Doxycyclin, in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

BeispieleZelllinien

HeLa und 293 humane embryonale Nierenzellen wurden in HGDMEM (Gibco, Rockville, MD) kultiviert. Humane RT-4 Blasenkrebszellen und humane Colon Adenokarzinomzellen HT29 wurden in McCoy-Medium (Gibco) gehalten. MCF-7 und BT-20 humane Brustkrebszellen sowie humane Colon (Colo 205 und SkCO-1) und pankreatische Adenokarzinom- (Aspc-1) Zelllinien ließ man in RPMI-Medium (Gibco) wachsen. HepG2 humane hepatozelluläre Karzinomzellen wurden in MEM-Medium (Gibco) gehalten. Zellen wurden kultiviert und gemäß Standardvorschriften aufgeteilt. Alle Medien waren mit 10% fötalem Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1% Glutamin (Gibco) supplementiert. Die humane Myelomzelllinie U266 ließ man in RPMI-Medium wachsen, das mit 15% FBS (Clontech) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) supplementiert war.

Beispiel 1Plasmidkonstruktion

DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt und aus der Agarose mit dem Gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) eluiert. DH5alpha-Zellen wurden zur Plasmidvermehrung eingesetzt. Plasmid-DNA wurde unter Verwendung eines modifizierten Protokolls für eine alkalische Lyse, gefolgt von einer Reinigung über eine kommerziell

erhältliche Ionenaustauschsäule nach Angaben des Herstellers (Qiagen), präpariert. Vor der Transfektion wurden LPS-Verunreinigungen in den Plasmid-DNA-Präparationen durch eine Triton X-117 Extraktionsmethode (M. Cotton et al., Gene therapy 1 (1994) 239-246) reduziert. Das Plasmid pBIG 3r, das das autoregulierte tTA Expressionssystem enthält, ist vorbeschrieben (C.A. Strathdee, Gene 229 (1999) 21-29). Die Luciferase cDNA wurde aus dem Plasmid pGL3basic (Promega, Madison, WI) durch BglII- und XbaI-Verdau erhalten und in pBIG 3r inseriert, das mit SpeI und BamHI gespalten wurde, was zur Erzeugung von pBIG 3r luc führte. Die adenovirale Plasmid pAd.CMV-Expressionskassette wurde durch Verdau mit XbaI und SalI nach Auffüllen mit T4 DNA-Polymerase entfernt. pBIG 3r luc wurde mit PvuII und SalI verdaut, und die Fragmente, die die bicistronische Expressionskassette enthielten, wurden in das Rückgrat von pAd.CMV-pA ligiert. Das resultierende adenovirale Plasmid pAd3r-luc enthielt die bidirektionale Expressionskassette, die an ihrem 5'-Ende durch die 1-456 bp des AD5-Genoms einschließlich Linker ITR und Verpackungssignale flankiert ist und die an ihrem 3'-Ende durch 3346-5865 bp des AD5-Genoms flankiert ist. Die von minimalen TK-Promotor getriebene Expression des tTA war antiparallel, und die durch den minimalen CMV-Promotor getriebene Expression des Luciferase-Gens war parallel zur adenoviralen E1-Transkription. Das Luciferase-Gen wurde aus pGL3-basic durch Verdau mit KpnI/SalI freigesetzt und in das adenovirale Expressionsplasmid pAd.CMV-pA ligiert, was zu pAd.CMV-luc führte. Die cDNA des einzelkettigen murinen Interleukin-12 wurde aus pSFG.IL-12.p40.L.p35 (G.J. Lieschke et al. Nat. Biotechnol. 15 (1997) 35-40) nach Verdau mit NcoI und EcoRV erhalten. Dieses Fragment wurde in den NheI/SalI-Ort von pAd.3r-luc subkloniert und ersetzte das Luciferase-

Gen. Das nachfolgend verwendete Plasmid pAd.CMV.p40.IRES.p35 enthält die zwei murinen IL-12 Untereinheiten, die durch eine Internal Ribosome Entry Site (IRES) des Enzephalomyocarditis-Virus getrennt sind. Die Expression dieses Konstrukts steht unter der Kontrolle des humanen Zytomegalovirus (CMV) Promotor-Elements von -601 bis -14 relativ zum Transkriptionsstart.

### Beispiel 2

#### Erzeugung und Amplifikation rekombinanter adenoviraler Vektoren

Rekombinante E1- und E3-deletierte Adenoviren wurden erhalten und Plaque-gereinigt nach Kalziumphosphat-vermittelter Cotransfektion von pAd.3r-luc, pAd.CMV-luc, pAd.3r-scIL-12 oder pAd.CMV.p40.IRES.p35 mit pBHG10 (AJ Bett et al., PNAS USA 91 (1994) 8802-8806). Die E1- und E3-deletierten Adenoviren wurden in 293-Zellen repliziert und durch CsCl-Zentrifugation wie zuvor beschrieben (FL Graham, Virology 54 (1973) 536-539) gereinigt. Die Titration der gereinigten Viren wurde mittels Plaque-Assay durchgeführt. Die resultierenden Titer für Ad.3r-luc, Ad.CMV-luc, Ad.3r-scIL12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 waren  $1,0 \times 10^{10}$  p.f.u./ml (plaque forming units pro ml),  $7,5 \times 10^9$  p.f.u./ml,  $6,7 \times 10^9$  p.f.u./ml und  $8,0 \times 10^9$  p.f.u./ml. Virale DNA wurde erhalten (Qiagen DANN Blood Kit) zur Sequenzanalyse, um die Insertion, die Transaktivator-Sequenz und die Orientierung zu bestätigen.

Beispiel 3In vitro adenovirale Transfektion

HT29, Colo205, SkCO-1, AsPc-1, HepG2, MCF-7, BT-20, HeLa, RT4 und U266 Zellen wurden in Platten mit sechs und zwölf (U266) Kavitäten bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kapitän 6 Stunden vor der Transfektion gesät. Die größeren HeLa-, RT-4- und 293-Zellen wurden bei einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Kapitän gesät. U266-Myelomzellen wurden in Suspensionskultur wachsen gelassen und infiziert. Gereinigte virale Partikel wurden in Medien ohne Supplementierung verdünnt, und die Zellen wurden 500  $\mu$ l der geeigneten Virusverdünnung pro Kapitän für 1 Stunde ausgesetzt. Nach Entfernung des infektiösen Überstands wurden vollständige Medien, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Doxycyclin supplementiert waren, zugefügt. Die Medien wurden alle 24 Stunden gewechselt.

Beispiel 4Quantifizierung der Transgen-Expression

24 Stunden nach Infektion mit Ad.CMV-luc oder Ad.3r-luc wurden die Zellen mit 150  $\mu$ l Zellkultur-Lysisreagens nach den Angaben des Herstellers (Promega) geerntet. Die Luciferase-Aktivität in 20  $\mu$ l Zell-Lysat wurde unter Verwendung eines Bertold LB9507 Luminometers und Luciferase-Assaysubstrat (Promega) gemessen. Die Standardkurven wurden unter Verwendung von rekombinanter Leuchtkäfer-Luciferase (Promega), das mit CCLR auf Konzentrationen von 1 pg/ml bis

300 ng/ml verdünnt war, erzeugt. Da die rlu bei höheren Konzentrationen ein Sättigungsprofil zeigen, wurde ein 2-Phasen exponentielles Assoziations-Kurvenfitting unter Verwendung des Prism Software-Pakets (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des DC-Protein-Assaykits (BioRad, Hercules, CA) bestimmt.

Die Quantifizierung des einzelkettigen und heterodimeren mIL12 in zellfreiem Überstand nach adenoviraler Infektion von Tumorzellen wurde durch einen IL12 p70 ELISA (OptEIA™, Pharmingen) durchgeführt, wobei gleiche Immunreaktivität und Molekulargewicht für beide Formen angenommen wurde. Splenozyten wurden mit Hilfe von Standardverfahren isoliert. Gehirnzellen wurden dann für drei Tage mit RPMI 1649 kultiviert, das mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin in anti-Maus CD3-beschichteten Kolben in Gegenwart von anti-human CD28 (5µg/ml) kultiviert, um T-Zellen anzureichern und die mIL-2-Sekretion zu stimulieren. Die Bioaktivität wurde nach Zugabe von 50-fach verdünntem konditionierten Überstand aus Ad.3r-scIL12 (+/- Doxycyclin), Ad.CMV-p40.IRES.p35 und mock-infizierten HT29-Zellen zu 4 x 10<sup>4</sup> murinen Splenozyten in einem finalen Volumen von 125 µl für 24 Stunden bestimmt. Murines IFN-γ wurde in Splenozyten-freiem Überstand unter Verwendung eines IFN-γ ELISA (OptEIA™, Pharmingen) quantifiziert. Um die spezifische Bioaktivität zu bestimmen, wurden halblogarithmische Verdünnungen von konditioniertem Überstand von beiden Formen des adenoviral exprimierten mIL-12 und Baculovirus-exprimiertem, gereinigtem mIL12 (R&D systems) auf mIL-12-Immunreaktivität (p70 ELISA) und IFN-γ-Induktion in Splenozyten wie beschrieben getestet. Die Bioaktivität von adenoviral exprimiertem heterodimerem

IL-12 kann durch die Bildung inhibitorischer p40-Homodimerer wie anderweitig beschrieben reduziert werden. Es wurde vorliegend kein Capture-Bioassay verwendet, um potentiell niedrigere Bioaktivität *in vivo* zu reflektieren.

### Beispiel 5

#### Alternative Klonierungsstrategie

#### Klonierung von adenoviralen Expressionsplasmiden für die Virussynthese mittels AdEasy System

Als Alternative zu der beschriebenen Virussynthese wurden adenovirale Expressionsplasmide entwickelt, die eine Virusgeneration mittels AdEasy®-System (Stratagene) ermöglichen. Dazu wurde der pShuttle Vektor (Stratagene) mit KpnI verdaut, gebluntet, und nachfolgend mit SalI verdaut. Das 3r-Insert wurde aus pBIG3r mittels Verdau mit PvuII und SalI isoliert und in den pShuttle ligiert. Das resultierende Plasmid pShuttle3r ermöglicht die einfache Generation verschiedener adenoviraler Vektoren zur Doxyzyklin-supprimierbaren Genexpression. Das humane Single-Chain Interleukin-12 kann nachfolgend mittels XhoI in die multiple cloning site des pShuttle3r kloniert werden und resultiert in pShuttle3r-hscIL12 (siehe Abbildung).

Die Virusgeneration erfolgt dann durch homologe Rekombination mit pAdEasy-1® in BJS183 E. coli-Zellen und Selektion für Kanamycin. Nach Transfektion von 293 Zellen mit dem Rekombinationsprodukt entstehen in diesem System replikative rekombinante adenovirale Vektoren (T He, S Zhou et al. Proc Natl Acad Sci USA 95 (5): 2509-14).

Die Virusproduktion erfolgt dann wie vorbeschrieben in 293-Zellen.

Beispiel 6Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Immunblotting

Nach Infektion von HT29-Colon Krebszellen wurden Lysate auf 15% Acrylamid SDS-Gele nach Kochen in Laemmli-Probenpuffern unter reduzierenden Bedingungen geladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf 0,45 µm Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) transferiert und mit TBS-enthaltender 5% nicht-fetter Trockenmilch für 1 Stunde geblockt. Actin und das Fusionsprotein tTA wurden unter Verwendung eines Kaninchen anti-Actin Affinitäts-isolierten Antigen-spezifischen Antikörpers (#A2066, Sigma, St. Louis, MS) und eines Maus anti-TetR monoklonalen Antikörpers (M. Gossen et al., PNAS USA 89 (1992) 5547-5551) (#8632-1, Clontech) nachgewiesen. Nach Inkubation für 1 Stunde wurden die Blots mit TBS-enthaltendem 0,1% Tween-20, pH 7,5, gewaschen und mit anti-Kaninchen und anti-Maus Peroxidase-verknüpften sekundären Antikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Proteine wurden schließlich nach Waschen und Chemolumineszenz-Nachweis (SA Nesbitt et al. Anal. Biochem. 206 (1992) 267-272) (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) nach Vorschrift des Herstellers visualisiert.

Beispiel 7Tetracyclin-Screening von Blutspender-Seren

Eine Frau und sieben Männer im Alter zwischen 23 und 35 Jahren wurden als Probanden ausgewählt. Sie hatten für

mindestens einen Monat keine antiinfektiöse Behandlung erhalten. Alle waren gesund und unter einer westlichen Standardernährung. 50 ml peripheren venösen Bluts wurden entnommen, und das Serum wurde nach Standardverfahren erhalten. Die Seren unterliefen einem Gefrier-Auftau-Zyklus, bevor die Zellkultur-Experimente und Tetracyclin-Bestimmungen durchgeführt wurden. Humane Seren wurden anstelle von FBS den Zellkulturmedien zugegeben. Tetracyclin-HCl wurde von Fluca Chemicals (Fluca, Germany) gekauft. Bakerbond RP-18 Festphasenextraktions (SPE)-Säulen wurden von Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ) erhalten, Lösungsmittel in HPLC-Qualität und andere Chemikalien wurden von Merck (Whitehouse Station, NJ) gekauft. HPLC wurde an Constametric 3500 MS und RP-18 HyPURITY® ADVANCE-Säulen von ThermoQuest (Deutschland) durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung von Chemstation Software von Agilent (Deutschland) nach Vorkonditionierung der RP-18-Säulen mit 2 x 1 ml Methanol, gefolgt von 2 x 1 ml Wasser, wurden 3 ml Serum, das 0,1 mol/l Citratpuffer (pH 6,8) und 0,1 mol/l EDTA enthielt, bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. zugegeben. Die Säulen wurden dann mit 10 ml Wasser und 1 ml Methanol gewaschen. Tetracyclin wurde mit 4 ml Methanol, das 0,1% Trifluoressigsäure enthielt, eluiert (ME Sheridan et al. J. Chromatography 434 (1988) 253-258). Das Eluat wurde getrocknet und in 100 µl 0,01% Oxalsäure in Wasser/Acetonitril (98/2 v/v) bei einem mit HCl eingestellten pH-Wert von 2,0 rekonstituiert. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur und einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 ml/min. durchgeführt. Die Fluoreszenz bei 416 nm (Anregung) und 515 nm (Emission) wurde durch Komplexierung des Tetracyclins mit 0,2% (w/v) Zirkonium(IV)chlorid erreicht (K. De Wasch et al. Analyst 123 (1998) 2737-2741). Die Kalibrierung wurde mit

wässrigen Lösungen von Tetracyclin HCl von 2 bis 100 ng/ml mit Variationskoeffizienten von 6,3% (während eines Tages) und 8,5% (von einem Tag auf den anderen) für 10 ng/ml durchgeführt.

### Resultate

#### **Konstruktion von Doxycyclin-supprimierbaren, auto-regulierten adenoviralen Vektoren**

Adenovirale Expressionsplasmide, die das Luciferase- und murine scIL-12-Gen unter Kontrolle des Tetracyclin-supprimierbaren autoregulierten Systems enthielten, pAd.3r-luc und pAd.3r-scIL-12 wurden erzeugt. Nach einem gleichen Verfahren wurden Plasmide erzeugt, die das Luciferase-Gen und die cDNA, die für murines p40 und p35, das durch einen Internal Ribosome Entry Site (IRES), jeweils unter Kontrolle des Zytomegalivirus (CMV)-Promotors, enthalten. Rekombinate E1/E3-deletierte Adenoviren Ad.3r-luc, Ad.3r-scIL12, Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35 (Figur 2) wurden durch Cotransfektion adenoviraler Expressionsplasmide mit pBHG10 erzeugt. Die Plaque-Reinigung und Amplifizierung wurde in 293-Zellen durchgeführt. Adenovirale Titer wurden durch Standard-Plaque-Assay-Techniken quantifiziert. Isolierung, Amplifikation und Plaque-Assay von Ad.3r-scIL12 war in Gegenwart von 2 µg/ml Doxycyclin bis zu 87-fach höher, was auf die Toxizität nicht supprimierter scIL12-Expression in 293-Zellen hinweist (Figur 3). Im Gegensatz dazu hatte Doxycyclin keinen Einfluß auf die Titrierung von Ad.3r-luc.

**Dosis-abhängige Doxycyclin-regulierte Luciferase- und Transaktivator-Genexpression**

Humane Colon-Krebszellen HT29 sind gegenüber adenoveraler Transduktion äußerst empfänglich, wie bereits zuvor gezeigt (A. Block et al. Cancer Gene Therapy 7 (2000) 438-445). Diese Zellen wurden mit Ad.3r-luc bei einer m.o.i. (multiplicity of infection) von 30 nach Inkubation mit Doxycyclin bei verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden infiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde in Zelllysaten entsprechend dem gelösten Zellprotein bestimmt. Bereits geringe Doxycyclin-Konzentrationen wie 100 pg/ml führen zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression. Die Genexpression wurde schließlich mit Doxycyclin-Konzentrationen von bis zu 3 µg/ml maximal supprimiert (Figur 4). Diese Doxycyclin-Konzentration wird üblicherweise in der klinischen Behandlung bakterieller Infektionen verwendet. Im vorliegenden experimentellen Ansatz lag eine bis zu 2400-fache Doxycyclin-vermittelte Suppression der Transgen-Expression vor.

Die dosis-abhängige, Doxycyclin-regulierte Supression der positiven Feedback-Schleife (Figur 1) wurde durch Nachweis der tTA Fusionsproteine mit Tet-R monoklonalen (M. Gossen et al., PNAS U.S.A. 89 (1992) 5547-5551) und VP16 polyklonalen Antikörpern (PE Pellett et al. PNAS U.S.A. 82 (1985) 5870-5874) in Western Blot-Analysen illustriert (Figur 5). Steigende Doxycyclin-Konzentrationen führten zu einer Herunterregulierung der intrazellulären tTA-Anteile, was mit einer verminderten Luciferase-Genexpression korreliert.

**M.O.I.-abhängige, supprimierbare Luciferase-Expression**

HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-luc bei einer m.o.i. im Bereich von 0,1 bis 100 nach Inkubation in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxycyclin bei 2 µg/ml für 24 Stunden infiziert. Die Suppression der Luciferase-Gen-Expression in Lysaten von Ad.3r-luc-infizierten HT29-Zellen bewegte sich von 470 (m.o.i.: 0,3) bis 2400-fach (m.o.i.: 10 - 100) (Figur 6). Das Ausmaß der Suppression blieb bei hohen m.o.i. konstant, was für eine ausreichende, mit der Transgen-Expression zusammenhängende Toxizitätskontrolle entscheidend ist. Doxycyclinkonzentrationen von 2 µg/ml störten die adenovirale Genexpression in HT29-Zellen unter Verwendung des konstitutiven CMV-Promotors nicht. Um die Effizienz der Ad.3r-luc-vermittelten transgenen-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin zu untersuchen, wurde die Expression mit der Expression in HT29-Zellen verglichen, die mit Ad.CMV-luc infiziert waren (Figur 7). In HT29 zeigte Ad.3r-luc eine höhere Genexpression als Ad.CMV-luc über alle getesteten m.o.i. (1 - 100), wobei der Faktor zwischen 18-fach (m.o.i.:100) und 240-fach (m.o.i.:1) lag.

**M.O.I.-abhängige regulierte Expression des einzelnkettigen murinen Interleukin-12**

HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-scIL-12 bei einer m.o.i. im Bereich von 1 bis 100 infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 µg/ml Doxycyclin für 24 Stunden inkubiert. Die Genexpression von scIL-12 wurde um mehr als 1400-fach bei einer m.o.i. von 100 in Gegenwart von Doxycyclin supprimiert (Figur 8). Die Western Blot-Analyse zeigte eine mit der IL-12 Expression korellierende Transaktivator (tTA)-Expression

(Figur 9). Nicht-supprimierte 3r-vermittelte IL-12 Genexpression war 11-fach (m.o.i.:1) bis 375-fach (m.o.i.:100) höher als unter Verwendung des konstitutiven CMV-Promotors, wobei von gleicher Immunreaktivität des p70-ELISA gegenüber dem einzelkettigen Interleukin-12 und der CMV-gesteuerten Expression eines p40/p35-Heterorotrimers ausgegangen wurde. Die Bioaktivität beider Formen wurde durch Inkubation muriner Splenocyten mit 50-fach verdünnten konditionierten Medien nach Infektion von HT29 mit IL-12 exprimierenden Adenoviren quantifiziert (Figur 10). Es wurde eine hohe Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Sekretion der Splenocyten durch Inkubation mit konditionierten Medien nach Infektion von HT29 mit Ad.3r-sc-IL-12 erhalten. Diese IFN- $\gamma$ -Induktion war verglichen mit der Infektion von HT29 mit dem gewöhnlich verwendeten Ad.CMV-p40.IRES.p35 signifikant höher. Die Zugabe von Doxycyclin resultierte in einer Suppression von IFN- $\gamma$  auf einen Hintergrund-Level. Ferner wurde die spezifische Bioaktivität adenovirale exprimierter Formen von IL-12 im Vergleich zu rekombinant gereinigten p40/p35-Heterodimeren analysiert (Figur 11). Murine Splenocyten wurden mit halblogarithmischen Verdünnungen von rekombinant heterodimerem IL-12 oder konditionierte Medien enthaltendem IL-12 wie beschrieben inkubiert. Die IFN- $\gamma$ -Induktion korellierte mit der Immunreaktivität von IL-12 in den Medien, wie durch p70-ELISA nachgewiesen wurde. Die basale Induktion wurde durch Präinkubation von Splenocyten mit Anti-humanen CD28-Antikörpern verursacht, was zur IL-2-Expression und nachfolgenden IFN- $\gamma$ -Induktion führte (CH June et al., J. Immunol. 143 (1989) 153-161). Die Bioaktivität des murinen einzelkettigen IL-12 Fusionsproteins war mit dem gereinigten, rekombinanten p40/p35-Heterodimer vergleichbar. Die

reduzierte Bioaktivität von IL-12, das nach Infektion mit dem gewöhnlich verwendeten Ad.CMV-p40.IRES.p35 exprimiert wurde, erklärt sich durch inhibitorische p40-Homodimere (P. Ling et al. J. Immunol. 154 (1995) 116-127; S. Gillesen et al. European J. Immunol. 25 (1995) 200-206; F. Mattner et al. European J. Immunol. 23 (1993) 2202-2208).

#### **Regulierte Interleukin-12 Genexpression in vitro**

Verschiedene Zelllinien des humanen Colon Karzinom (HT29, SkCo-1 und Colo205), pankreatischen Karzinom (Aspc-1), Blasen-Karzinom (RT4), Cervix-Karzinom (HeLa), Brust-Karzinom (MCF-7 und BT-20) sowie Myolom (U266) und hepatzelluläres Karzinom (HepG2) wurden entweder mit Ad. CMV.p40.IRES.p35 oder Ad.3r-scIL-12 infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxycyclin inkubiert. Die Expression des rekombinanten Interleukin-12 wurde unter Verwendung eines p70-ELISA wie zuvor beschrieben bestimmt (Figur 12). Die Doxycyclin-vermittelte Suppression der Interleukin-12-Expression trat in allen Zelllinien auf. In Abwesenheit von Doxycyclin erwies sich der 3r-Promotor gegenüber dem CMV-Promotor in allen Zelllinien mit Ausnahme der U266-Myolomzelllinie als überragend. Die Interleukin-12-Expression in Mock-transfizierten Zelllinien wurde nicht nachgewiesen. Die Suppression des IL-12 war 3,9-fach in U266 und bewegte sich von 167 (HepG2) bis 6000-fach (Aspc-1). Mit Ausnahme von U266, wo eine gegenüber der CMV-vermittelten IL-12-Expression signifikant geringere 3r-vermittelte IL-12 Expression vorlag, führte der 3r-Promotor in allen anderen Krebszelllinien zu 17-fach (SkCo-1) bis 4254-fach (Colo205) höherer Genexpression in Abwesenheit von Doxycyclin.

**Regulierte Genexpression nach Inkubation mit Humanserum**

In Abetracht der geringen Doxycyclin- und Tetracyclin (tet)-Konzentrationen, die zur Suppression der Transgen-Expression erforderlich sind, wurde die Regulation in humanen Colon-Krebszellen in Gegenwart von humanem Serum untersucht, um die Anwendbarkeit dieses Ansatzes in einem möglichen klinischen Umfeld zu prüfen. Serumproben von gesunden Probanden, die sich einer westlichen Standardernährung unterzogen, wurden unter Verwendung eines Standard HPLC-Verfahrens mit einer maximalen Sensitivität von 2 ng/ml auf Tetracyclin getestet, da Tetracyclin in der Nutztierhaltung breite Anwendung findet und eine Kontamination von Nahrungsmitteln anzunehmen ist. Die HPLC zeigte keine signifikanten Tetracyclin-Konzentrationen in allen getesteten Proben. HT29-Colon-Karzinomzellen, die nach Inkubation mit diesen humanen Seren mit Ad.3r-luc (m.o.i.: 30) infiziert wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Transgenexpression verglichen mit zertifiziertem, Tetracyclin-freiem fötalem Rinderserum (Figur 13). Diese Beobachtung spiegelt Tetracyclin-Konzentrationen in humanen Serumproben von weniger als 10 pg/ml wieder. Wie erwartet, führte die Supplementierung dieser Humanseren mit Doxycyclin (2 µg/ml) zu einer äußerst effizienten Suppression der Transgen-Expression.

Beschreibung der Figuren

**Figur 1.** Prinzip einer autoregulierten, Tetracyclin-abhängigen Transaktivator-Expression. Der bidirektional tetrarepressive Promotor kontrolliert sowohl das Transgen als auch die Transaktivator-Expression. Bindung des Transaktivators in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin resultiert in einer Amplifikation der Transaktivator-Expression durch eine positive Feedback-Schleife, ebenso wie in einer Induktion der Transgen-Expression. tTA, Tet-Repressor und VP16 Fusionsproteine; TKmin, minimaler Thymidin-Kinase-Promotor; CMVmin, minimaler Zytomegalovirus-Promotor; TetO,, heptamerisierter Tet-Operator.

**Figur 2.** Adenovirale Vektorkarten. Die autoregulierte Tetracyclin-Expressionskassette ist in die  $\Delta$ E1-Region des adenoviralen Genoms inseriert. Zur Vermeidung von kryptischem Splicing und um RNA-Stabilität zu erhalten (Ad.3r-luc und Ad.3r-scIL12) wurde ein Intron aufwärts vom Aktivator und dem Luciferase- oder Interleukin-12-Gen aus der Maus eingefügt. Zusätzlich wurden rekombinante adenovirale Vektoren für die Expression des Luciferase- oder des heterodimeren Interleukin-12-Gens der Maus unter der Kontrolle des CMV-Promotors konstruiert (Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35). E1 und E3, Early regions des adenoviralen Genoms; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; CMV, Zytomegalievirus-Promotor; TK, Thymidin-Kinase-Promotor.

**Figur 3.** Plaque-Assay von Ad.3r-scIL12 in An- und Abwesenheit von Doxycyclin in einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml. Titration von Ad.3r-scIL12 in 293-Zellen resultiert in einer erheblich

höheren Ausbeute, wenn die Expression des Transgens durch Zugabe von Doxycyclin unterdrückt wird. Dox, Doxycyclin.

**Figur 4.** Dosisabhängige Luciferase-Expression nach Infektion von HT29 Dickdarmkrebszellen mit Ad.3r-luc gefolgt von verschiedenen Konzentrationen des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin.

**Figur 5.** Westernblot-Analysen des Transaktivators zeigen die positive Rückkoppelungsschleife nach adenoviraler Infektion von HT29-Zellen unter Inkubation mit unterschiedlichen Mengen von Doxycyclin. Die Figur zeigt die Unterdrückung der Expression des tTA Fusionsproteins in Anwesenheit von Doxycyclin. dox, Doxycyclin.

**Figur 6.** Unterdrückung der Luciferase-Genexpression nach Infektion von HT29-Zellen mit verschiedenen Multiplizitäten der Infektion (multiplicities of infection, m.o.i.). Doxycyclin-regulierte Genexpression wird in einem großen Infektionsbereich von wenigstens 0,1 bis 100 m.o.i. erzielt, die in einer 470- bis 2400-fachen Unterdrückung der Luciferase-Expression resultiert.

**Figur 7.** Vergleich der 3r-vermittelten Transgen-Expression bei Verwendung des konstitutiven Zytomegalievirus-Promotors. HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-luc oder Ad.CMV-luc in verschiedenen m.o.i. infiziert, gefolgt von einer Inkubation in Doxycyclin-freiem Medium.

**Figur 8.** Interleukin-12-Expression in HT29-Zellen nach Infektion mit Ad.3r-scIL12 in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin (2 µg/ml) oder Ad.CMV-mIL12 bei verschiedenen

m.o.i. Wie mit Luciferase-exprimierenden adenoviralen Vektoren gezeigt wurde, befindet sich in HT29 eine erheblich höhere Interleukin-12-Expression, wenn der 3r-Promotor verwendet wird. Zugabe von Doxycyclin führt zu einer Unterdrückung der Transgen-Expression unter das Niveau, das mit Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei der selben m.o.i. erzielt wird.

**Figur 9.** Westernblot-Analyse der tTA Transaktivator-Genexpression in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin nach Infektion mit Ad.3r-scIL12 bei verschiedenen m.o.i.. Beide Domänen des tTA Fusionsproteins wurden mit den TetT- und VP16-Antikörpern nachgewiesen. Die Expression des tTA Fusionsproteins korreliert mit der eingesetzten m.o.i.. Zugabe von Doxycyclin in einer Konzentration von 2 µg/ml resultiert in einer Unterdrückung der tTA Expression. TetR, Tetracyclin-Repressor; VP16, Herpes simplex Virus transkriptionale Aktivierungsdomäne.

**Figur 10.** Induzierung der Interferon-γ-Expression nach Inkubation von Splenozyten mit konditioniertem Überstand von infizierten HT29-Zellen. 10<sup>6</sup> HT29-Zellen wurden mit Ad3r-scIL12 (+/- Dox) oder Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei einer m.o.i. von 30 für 24h infiziert. Infektion von HT29 mit Ad.3r-scIL12 resultiert in einer starken Interferon-γ-Induktion im Vergleich zu einer Infektion mit Ad.CMV-p40.IRES.p35. Zugabe von Doxycyclin resultiert in einer Abnahme des Interferon-γ auf Hintergrundniveau in diesem Versuchsansatz.

**Figur 11.** Vergleich der Interferon-γ-Induktion durch adenoviral-exprimiertes Einzelketten- (single-chain), bzw. heterodimeres Interleukin-12, sowie durch aufgereinigtes rekombinantes Interleukin-12. Interleukin-12 im

konditionierten Überstand von infizierten HT29-Zellen wurde durch p70-mIL12 ELISA bestimmt. Mäuse-Splenozyten wurden dann mit seriellen Verdünnungen von entweder adenoviral exprimierten oder rekombinanten Interleukinen inkubiert und das induzierte Interferon- $\gamma$  wurde mit mIFN- $\gamma$  ELISA quantifiziert. Die Bioaktivität-Immunoreaktivität von Einzelketten-Interleukin-12 war vergleichbar zu rekombinantem aufgereinigtem heterodimerem Interleukin-12. Die spezifische Bioaktivität von adenoviral produziertem heterodimerem Interleukin-12 (Ad.CMV-p40.IRES.p35) scheint niedriger zu sein, wahrscheinlich durch inhibitorische p40 Homodimere.

**Figur 12.** Interleukin-12-Expression in verschiedenen Zelllinien nach Infektion mit entweder Ad.CMV-p40.IRES.p35 oder Ad.3r-scIL12 in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin. Unterschiedliche Stärken der Transgenexpression beruhen z.T. auf Unterschieden in der Transduktionseffizienz. Mit Ausnahme der U266 Myelomzelllinie war die 3r-vermittelte Genexpression deutlich höher als die CMV-vermittelte Expression.

**Figur 13.** Inkubation von Ad.3r-luc infizierten HT29 Dickdarmkarzinomzellen mit menschlichen Seren anstatt zertifiziertem Tetracyclin-freien fötalem Rinderserum. Es gab keine signifikanten Unterschiede bei der Verwendung von menschlichem Serum von Probanden mit einer standardisierten westlichen Ernährung im Vergleich mit zertifiziertem Tetracyclin-freiem fötalem Kälberserum. Diese Daten legen eine Tetracyclin-Konzentration bei den menschlichen Probanden von unter 50 pg/ml nahe. Die Ergänzung der menschlichen Sera mit Doxycyclin (2  $\mu$ g/ml) resultiert in einer Unterdrückung der Transgen-Expression wie vorgehend gezeigt. FCS, fötales Kälberserum.

Patentansprüche

1. Rekombinanter viraler Vektor, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron<sup>1</sup> - TK<sup>+</sup> - TetO, - CMV<sup>+</sup> - Intron<sup>2</sup> - Transgen

aufweist, wobei

TetO, der heptamerisierte Tetracylin-Operator ist,  
TK<sup>+</sup> der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,  
tTA eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,  
CMV<sup>+</sup> der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und  
Transgen eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,  
Intron<sup>1</sup> eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und  
Intron<sup>2</sup> eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist.

3. Vektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.
4. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert zwischen 'CMV' und 'Intron<sup>2</sup>' oder zwischen 'Intron<sup>2</sup>' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthält.
5. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Transgen eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2), Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) kodierende Nukleinsäuresequenz ist.
6. Vektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß IL-12 ein single-chain Interleukin-12 ist.
7. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus ist.
8. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Insert in die E1- und/oder die E3-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert ist.
9. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß er durch homologe Rekombination eines

viralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist.

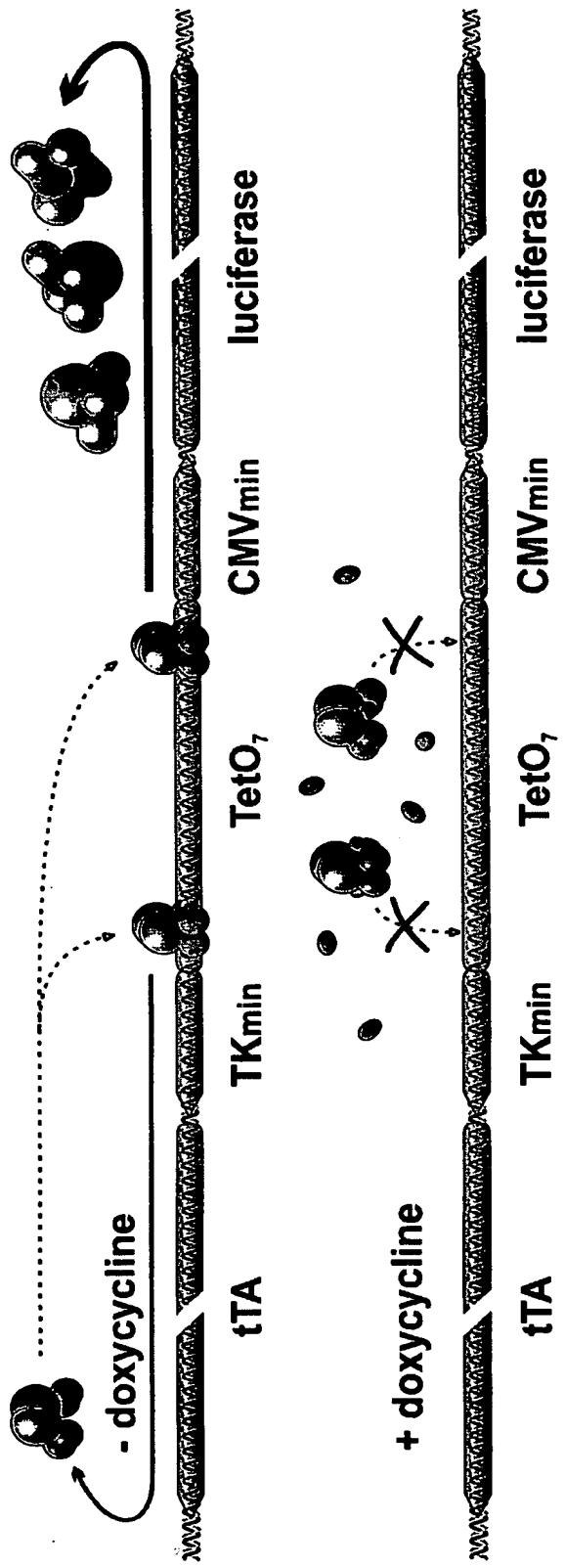
10. Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz.
11. Verwendung eines Plasmids nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Vektors nach den Ansprüchen 1 bis 9.
12. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9 zur *in vitro*-Genexpression in eukaryotischen Zelllinien.
13. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, in der Gentherapie.
14. Verwendung nach Anspruch 13, bei dem das Transgen IL-2, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  ist, zur Gentherapie maligner Erkrankungen.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die maligne Erkrankung ein solider Tumor ist.
16. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Genexpression mit Doxycyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert.
17. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben in

biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat Doxycyclin ist.

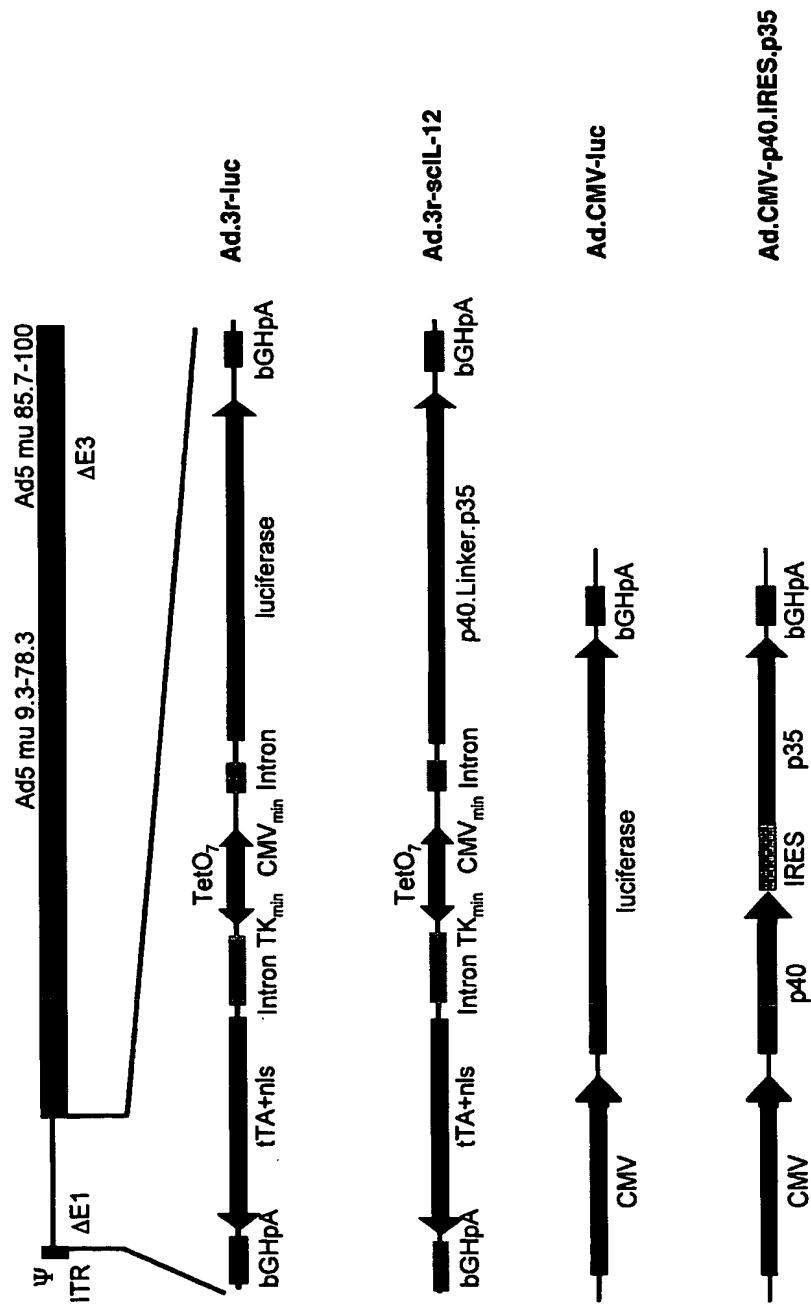
Block et al. 2002

**Figure 1**  
**Tet-OFF system**

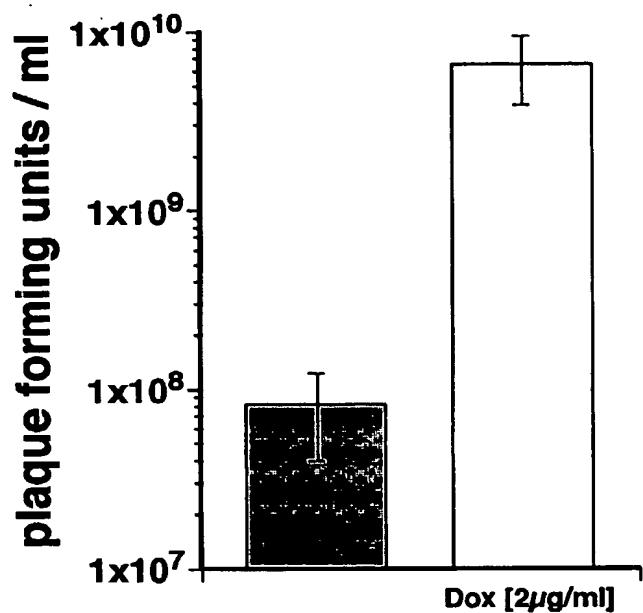
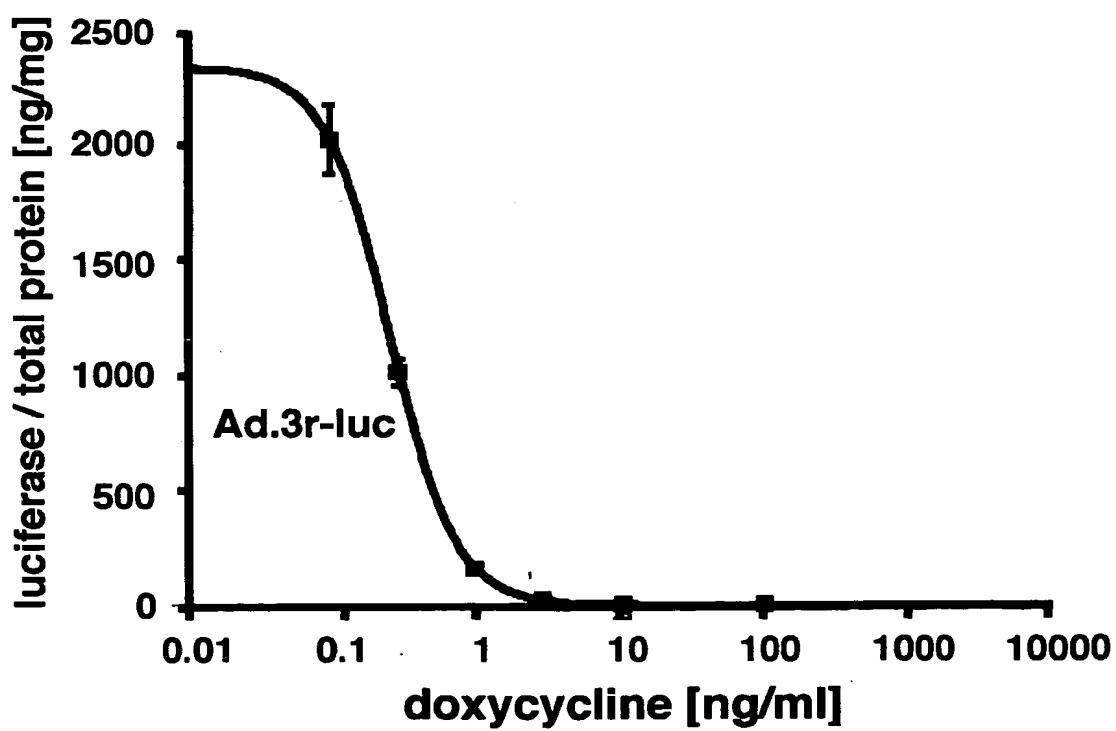


Block et al. 2002

Figure 2



Block et al. 2002

**Figure 3****Figure 4****Ad.3r-sclL<sub>12</sub>**

Block et al. 2002

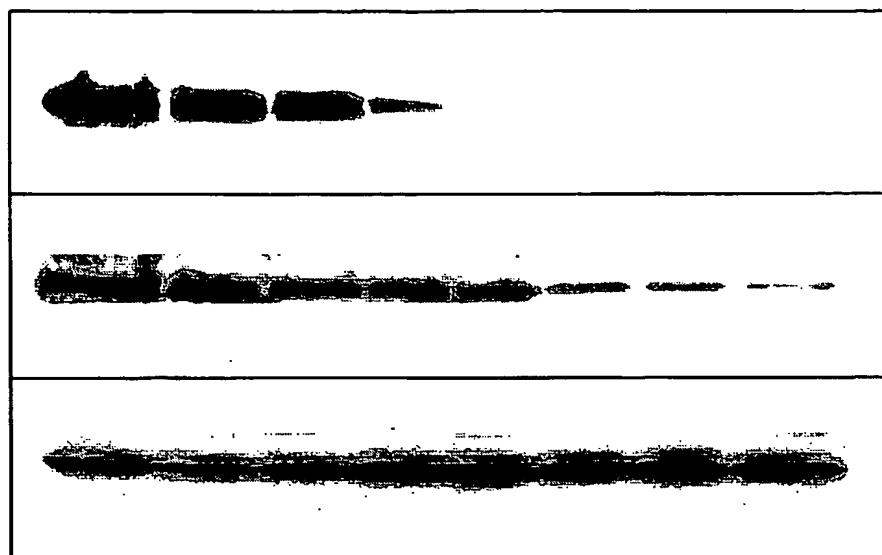
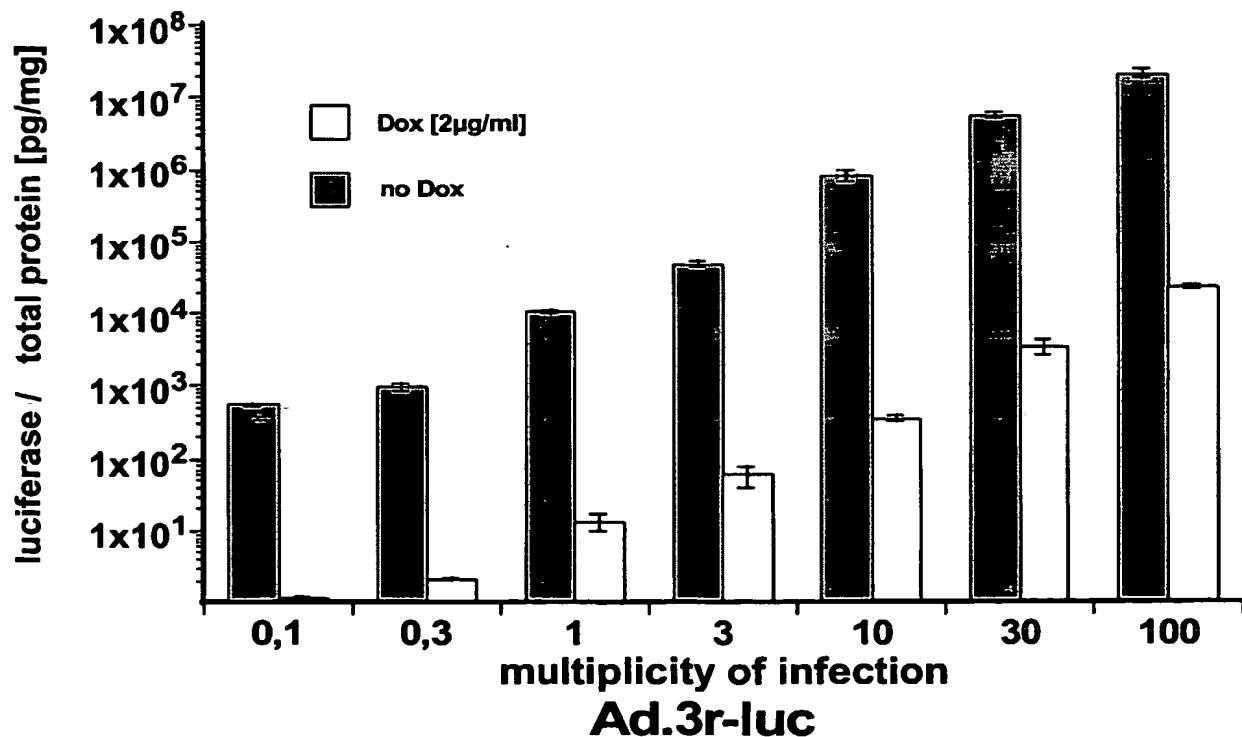
**Figure 5****Ad.3r- luc**

tetR

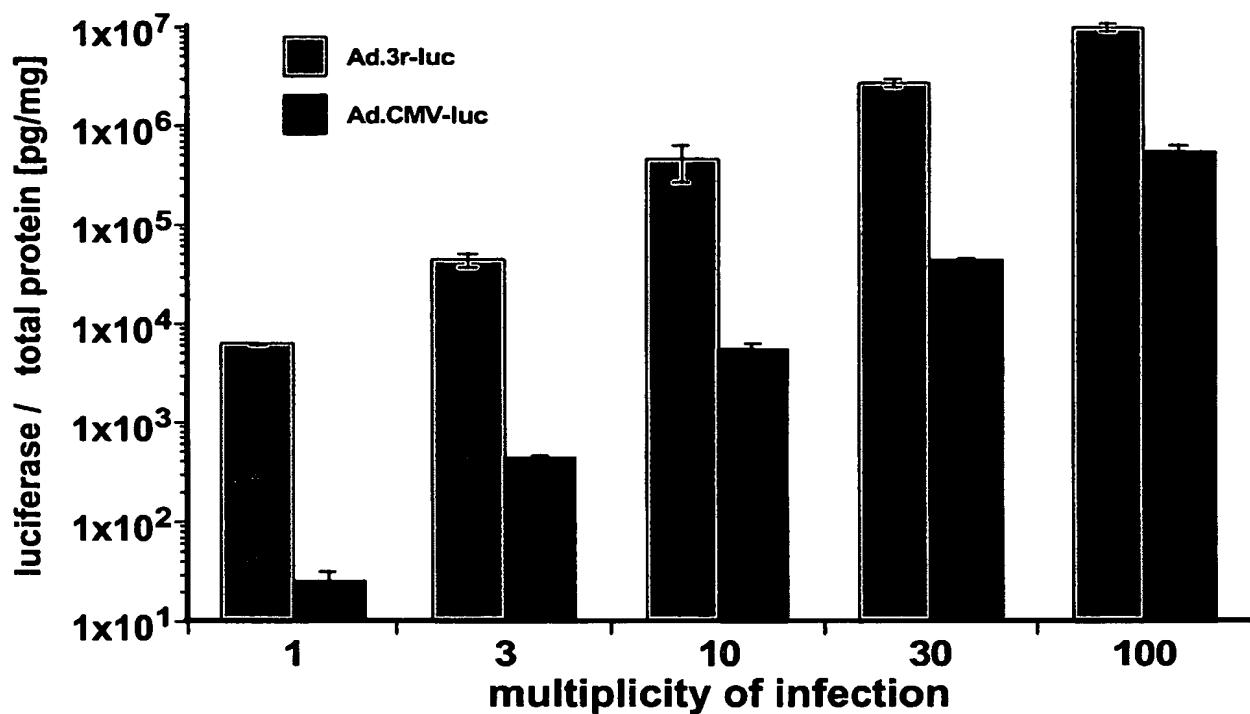
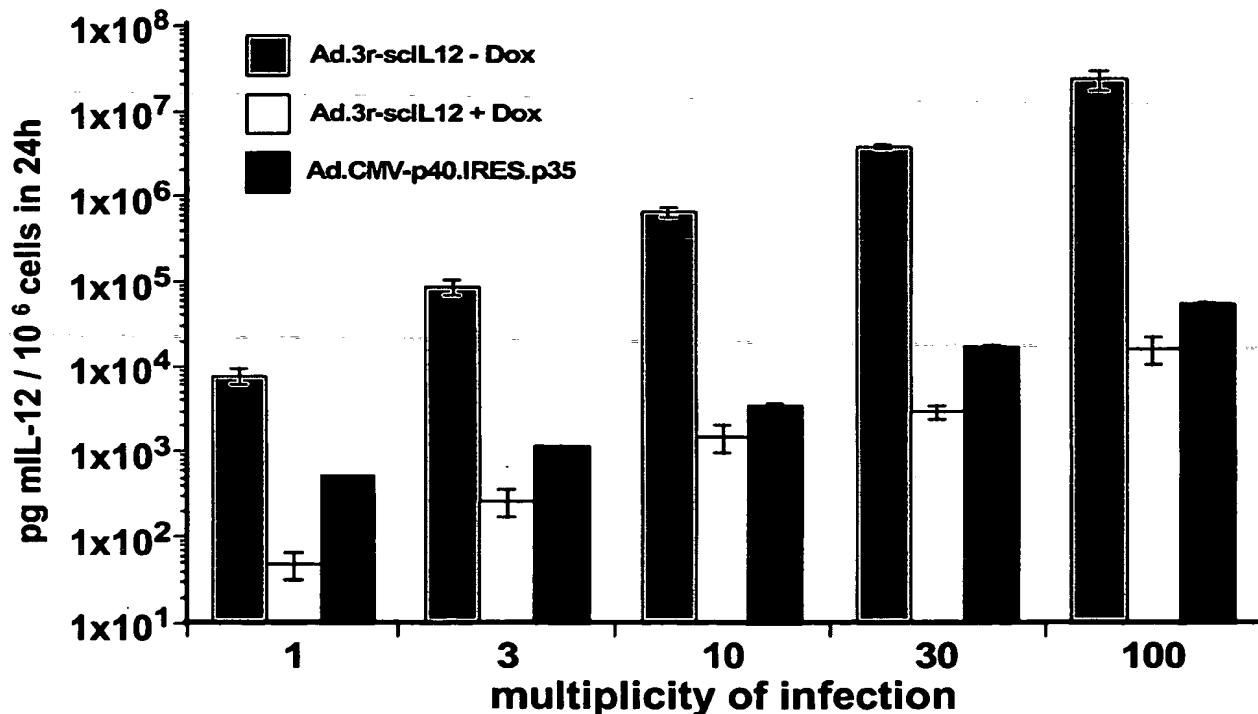
VP16

actin

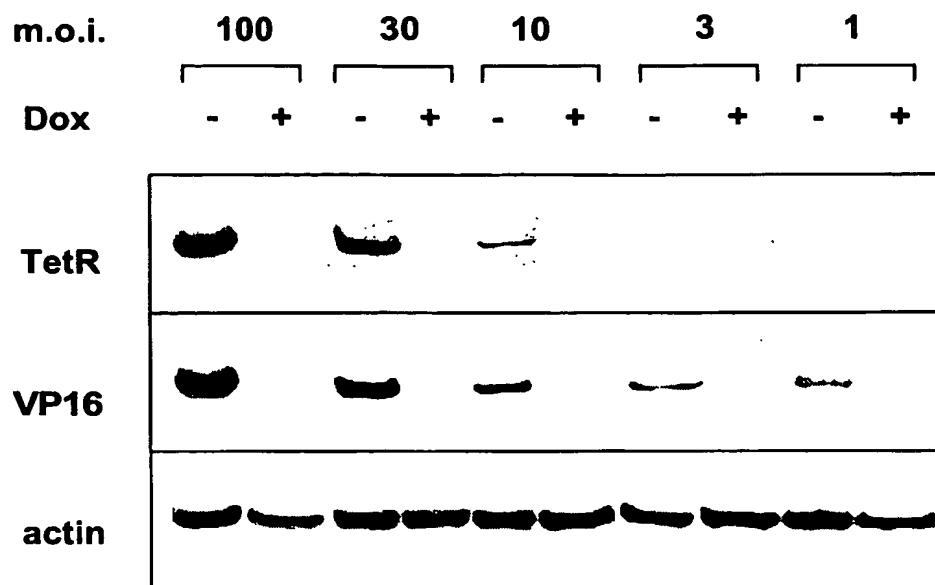
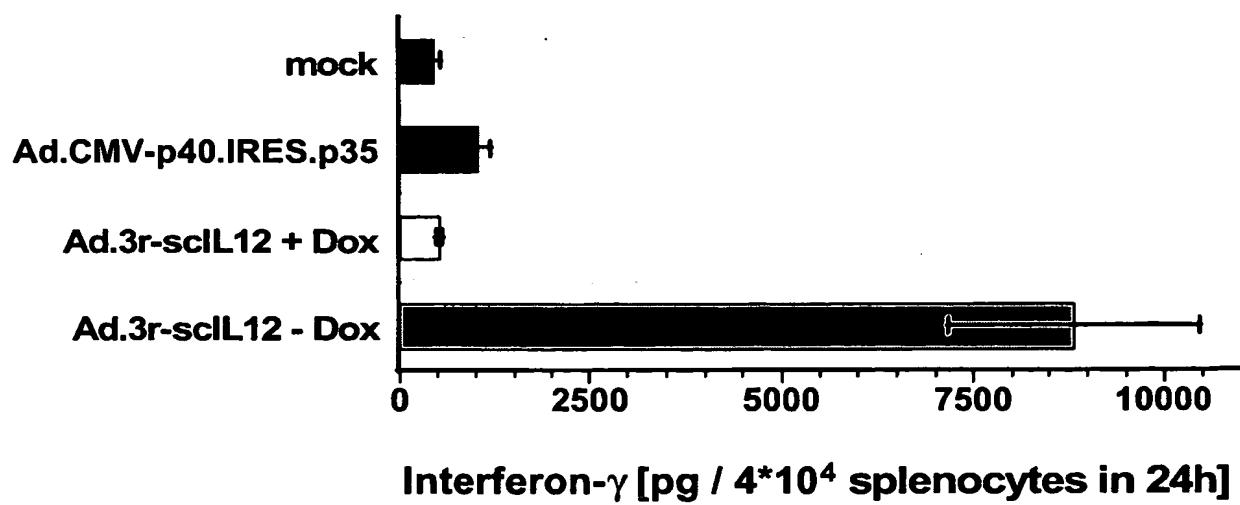
dox [ng/ml] 0 0.1 0.3 1 3 10 30 100

**Figure 6**

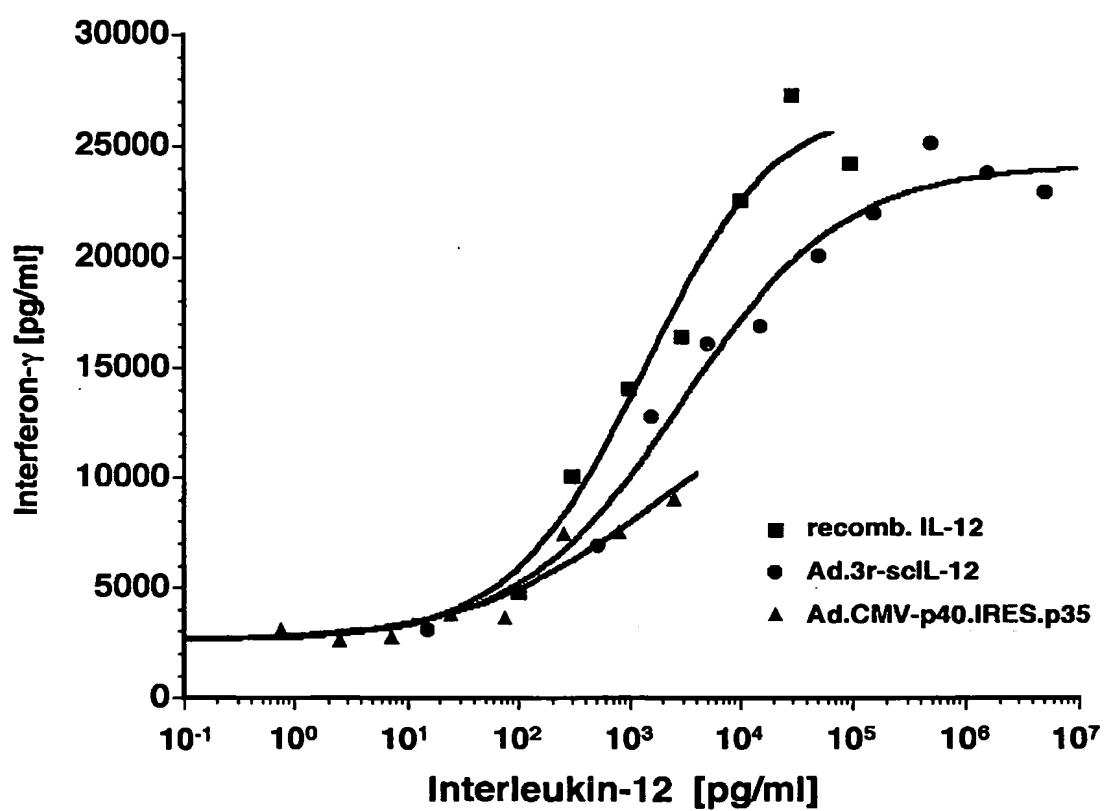
Block et al. 2002

**Figure 7****Figure 8**

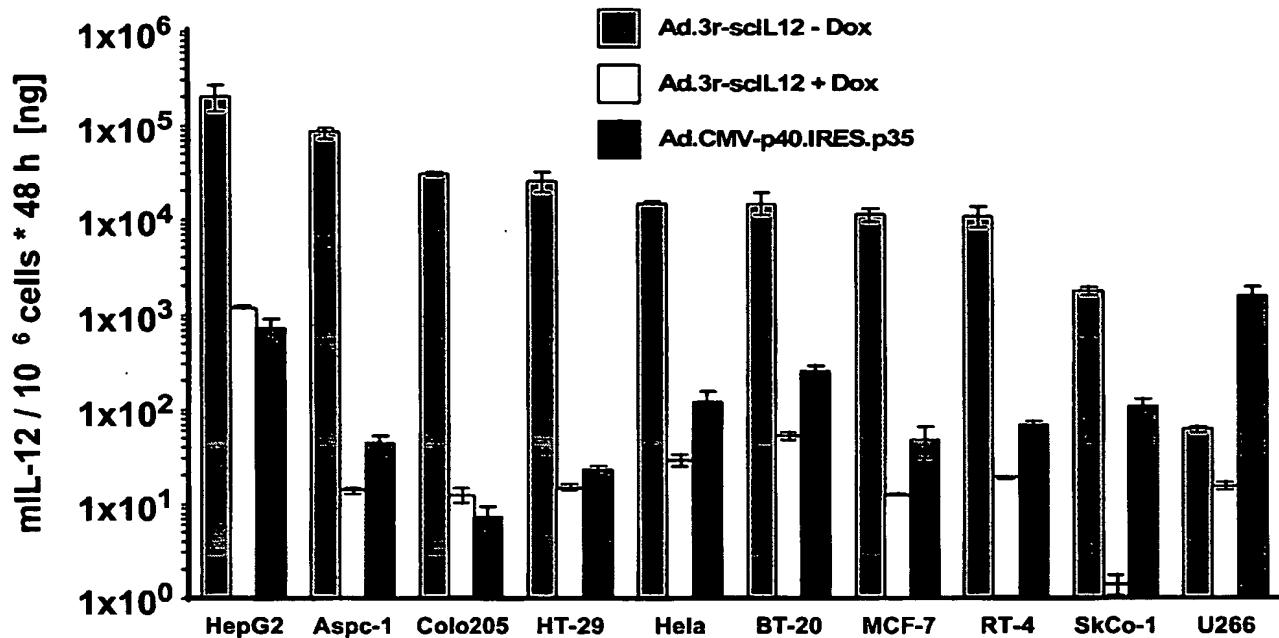
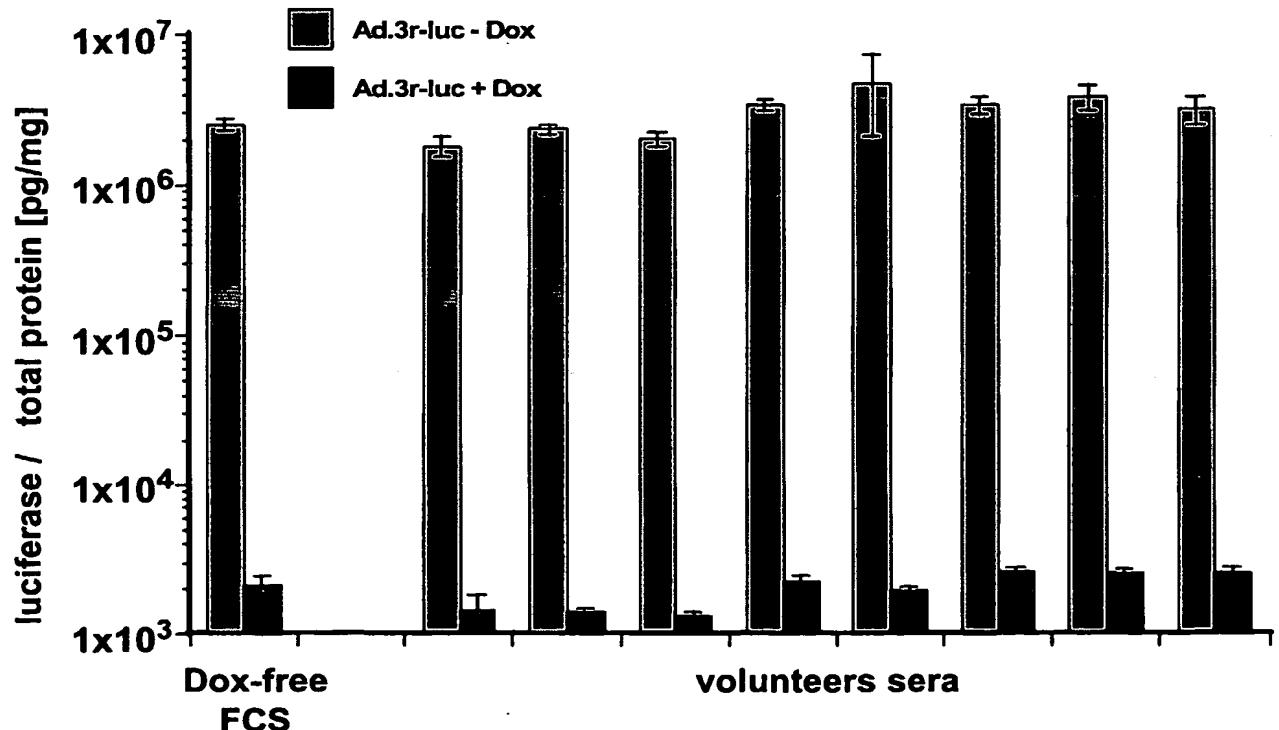
Block et al. 2002

**Figure 9****Ad.3r-sclL12****Figure 10**

Block et al. 2002

**Figure 11**

Block et al. 2002

**Figure 12****Figure 13**

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
<120> Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-regulierbaren  
Genexpression  
<130> P 63006  
<160> 5  
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 11569  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r.hscIL-12 zur regulierten  
Expression des humanen IL-12  
  
<220>  
<221> gene  
<222> (327)..(713)  
<223> VP16  
  
<220>  
<221> gene  
<222> (714)..(1352)  
<223> TetR  
  
<220>  
<221> Intron  
<222> (1353)..(1912)  
<223>  
  
<220>  
<221> promoter  
<222> (1864)..(1902)  
<223> TK-min  
  
<220>  
<221> protein\_bind  
<222> (1913)..(2212)  
<223> TetO7  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2213)..(2709)  
<223> CMV-min + Intron  
  
<220>  
<221> promoter  
<222> (2226)..(2264)  
<223> CMV-min

<220>  
 <221> gene  
 <222> (2710)..(4308)  
 <223> Humanes single-chain IL-12

<220>  
 <221> mutation  
 <222> (4020)..(4023)  
 <223> T/C, A/T, G/C, T/G

<400> 1

ctgctgggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccaccc	catccccagc	atgcctgtct	60
ttgtcttccc	aatcctcccc	cttgctgtcc	tgccccaccc	caccccccag	aatagaatga	120
cacctaactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gaggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaaatagg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aaaggccatcg	360
gtaaacatct	gctcaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgttaggg	ggcggaaatcg	420
tgggggttaa	atcccgacc	cggggaaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	categcccacg	tcctcgccgt	ctaaatggag	ctcgcccccc	540
aggctgacat	cggtcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccgc	ggggagaaaag	600
gacaggccgcg	gagccgcccag	ccccgcctct	tcggggggcg	cgtcgccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttcgtacgcg	cgcggctgt	cgcggaccacca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaatccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttgggt	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtaataa	tggccgcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttttctt	ttagcgactt	gatgtcttg	atcttccaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcatt	ataatgcatt	ctctagtgaa	960
aaaccttgtt	ggcataaaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcatactg	tttttctgt	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	ttttgtccca	tcgcgtatgac	tttagaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttctaaagg	gaaaaagtga	1140
gtatgggtcc	tatctaacat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gaaaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgttagg	ctgctctaca	cctagcttct	ggggaggttt	acgggttgtt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaatgcgc	tgttaatcac	tttactttta	1320
tctaatctag	agggtctggg	tctcttggc	atggtcgaat	taatcgct	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccgggtgg	acctggaggt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gaaaaagtgg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagccgt	ccacacctca	agctgacaa	1500
aaaaagatt	gtctttctg	accagatgga	cgcggccacc	ctcaaaggca	tcaccgggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatacct	cctcgaaaa	gaaaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620
gccccctttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	gttttccga	tccggtcgtat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cggtgccga	gtaccgttcg	gaggccgacg	gttccgtat	1740
ccaagagtac	tggaaagagcc	gcaagagtt	tgtctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgcgt	ggtcgctcg	tgttcggagc	cacacgcgtc	accttaat	gcaagtgga	1860
cctcggaccg	cggccggcccg	actgcattct	cgtgttcgaa	ttgccccggcg	agctcgactt	1920
tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaactcgac	tttactttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	gtttaactcg	actttactt	ttctctatca	ctgataggg	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgacttcc	actttttctt	2100
atcaactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaactcgcac	tttcactttt	ctctatcact	gatagggagt	gtttaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggaggccta	tataagcaga	gctcggtttag	tgaaccgtca	2280
gatgccttgg	agacgccatc	cacgctgttt	tgacccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggcccccaat	tgcgaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gtttaattgc	2400
taacgcagtc	agtgcctctg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	tgggtcgtg	2460
aggcactggg	caggtaaagta	tcaagttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgcgt	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacccatttg	gtcttactga	2580
catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactccca	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtaact	taatacgtact	caactatggc	tagcctcgag	aattcagcgc	tggtaccgag	2700
ctcggatcca	tgggtcacca	gcagttggc	atcttcttgg	tttccctgg	ttttctggca	2760
tctccctcg	tgccatatag	ggaactgaag	aaagatgtt	atgtcgaga	attggattgg	2820
tatccggatg	cccttggaga	aatgggtggc	ctcacctgtg	acaccctga	agaagatgg	2880
atcacctgga	ccttggacca	gagcagtgag	gtcttaggct	ctggcaaaac	cctgaccatc	2940
caagtcaaag	agtttggaga	tgctggcc	tacacctgtc	acaaaggagg	cgagggttcta	3000

agccatttcgc tcctgtgtct tcacaaaaaag gaagatggaa tttgggtccac tgatattttt  
aaggaccaga aagaacccaa aaataagacc tttctaagat gcgaggccaa gaattattct 3120  
ggacgtttca cctgtgtgtt gctgacgaca atcagtactg atttgacatt cagtgtcaaa 3180  
agcagcagag gctttctga ccccaagggg gtgacgtgct gagctgtac actctctgca 3240  
gagagagtca gggggacaa caaggagtt gactactg tggagtgcctt ggaggacagt 3300  
gcctgcccag ctgctgagga gactgtccc attgaggtca tgggtggatgc cgttcacaag 3360  
ctcaagtatg aaaactacac cagcagcttc ttcatcaggg acatcatcaa acctgaccca 3420  
cccaagaact tgagctgaa gccattaaag aattctcgcc aggtggaggt cagctggag 3480  
taccctgaca cctggagtac tccacattcc tacttctcc tgacattctg cgttcaggc 3540  
caggcaaga gcaagagaga aaagaaaat agacttca cggacaagac ctcagccacg 3600  
gtcatctgcc gaaaaaatgc cagcatttgc gtggggccc aggaccgcta ctatagctca 3660  
tcttggagcg aatgggcattc tgccttgc agtgggtggcg gtggggcg atctagaaaac 3720  
ctccccgtgg ccactccaga cccaggaatg tccatgccc ttccacactc cccaaaacctg 3780  
ctgagggccg tcagcaacat gtccttgc gccagacaaa ctctagaatt ttacccttgc 3840  
acttctgaag agattgtatca tgaagatatac aaaaaagata aaaccagcac agtggaggcc 3900  
tgtttaccat tgaattaaac caagaatgag agttgcctaa attccagaga gaccttttc 3960  
ataactaatg ggagttgcctt ggcctccaga aagacctttt ttatgtggc cctgtgcctc 4020  
tcgagtattt atgaagactc gaagatgtac caggtggagt tcaagaccat gaatgc当地 4080  
cttctgtatgg atccataagag gcagatctt ctatgtcaaa acatgtggc agttattgt 4140  
gagctgtatgc aggccctgaa ttcaacagt gagactgtgc cccaaaatc ctccctgaa 4200  
gaaccggatt ttataaaaac taaaatcaag ctctgcatac ttccatgc ttccagaattt 4260  
cgggcaatgtca ctattgtatag agtgtatggc tatctgtatgc ttccctaaa agcgaggctg 4320  
atccggatata gtccttgc taaaagacag gatatcagt gtccaggctc tagtttgac 4380  
tcaacaatata caccagctga agcctataga gtacgagcca tagataaaaat aaaagatttt 4440  
atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccccccactt tgtaggttt gcaagctagt 4500  
aacggccgccc agtgtgttgc aattctgcag atatccatca cactggggcc cgctcgagca 4560  
tgcatactaga gggccctatt ctatgtgtc acctaaatgc tagactgc tgatcgcct 4620  
cgactgtgcc ttcttagttgc cagccatctg ttgtttggcc cttccctgtg cttccctgaa 4680  
ccctggaaagg tgccactccc actgtccctt cctaataaaa tgaggaaattt gcatcgatt 4740  
gtctgagtag gtgtcattttt attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aaggggggagg 4800  
attggaaaga caatagcagg catgtgtggg atgcgggtggg ctctatggct tctgaggcgg 4860  
aaagaaccatgc tcgacatcgat tgctagatgt gaaggtgtcg aggtacgtg agacccgcac 4920  
caggtgcaga ccctgcgagt gtggcggtaa acatattagg aaccagccctg tgatgtgg 4980  
tgtgaccgag gagctgaggc ccgtactt ggtgtgtcc tgaccccgcc ctgagttttgg 5040  
ctctagcgtat gaagatacag attgaggtac taaaatgtgt ggggtgtggct taagggtggg 5100  
aaagaatata taaggtgggg gtcttatgtc gttttgtatc tggtttgcag cagcccccgc 5160  
cgccatgagc accaactcgt ttgtatggaa gatgggttcc agcattgtatg gtcggccctg 5220  
gccccatgg gcccgggtgc gtcagaatgt gatgggttcc agcattgtatg gtcggccctg 5280  
cctgcccgc aactctacta ctttgcacca gtagaccgtg tcttgcaccc cggtggagac 5340  
tgcagccctcc gcccggctt cagccgtgc agccaccgc cgccggattt tgactgactt 5400  
tgctttctgt agcccgcttgc caagcagtgc agcttccctg tcatccggcc gcgatgacaa 5460  
gttgacggct ctttggcac aattggatc tttgacccgg gaacttaatg tgctttctca 5520  
gcagctgttg gatctgcggc agcagggttc tgccctgtaa gcttccccc ctcccaatgc 5580  
ggttttaaaac ataaataaaa aaccagactc tggttggatt tggtatcaagc aagtgttctt 5640  
ctgtctttat ttaggggttt tgccgcgcg agtggccctg gaccagccgtt ctcggctgtt 5700  
gagggtcctg tttttttt ccagacgtg gtaaaaggtga ctctggatgt tcagatacat 5760  
gggcataagc ccgtctctgg ggtggaggta gtcaccactgc agagcttcat gctgcgggggt 5820  
ggtgtttagt atgatccagt cgtacgttgc gtagccctg ttttgcctaa aatgttctt 5880  
cagtagcaag ctgattgcca gggcaggcc gtcatactgt gggatatgtat gatgttccat 5940  
ctggatggg tgcatactgt gggatatgtat gatgttccat gactgttattt tttaggtggc 6000  
tatgttccca gccatataccc tccggggattt catgttgc agaaccacca gcacagtgt 6060  
tccgggtgcac ttggaaattt tgcatactgt gtttttttccat gtcacttgc gactgttattt 6120  
gacggcccttgc tgaccccttgc gattttccat gtcacttgc gactgttattt tttaggtggc 6180  
acggggccgcg gcctggggca agatatttct gtcacttgc gactgttattt tttaggtggc 6240  
gatgagatcg tcataggcata tttttacaaa gtcacttgc gactgttattt tttaggtggc 6300  
aatgggttcca tccggcccaag gggcgttagtt gtcacttgc gactgttattt tttaggtggc 6360  
gagttcagat ggggggatca tgcatactgt gtttttttccat gtcacttgc gactgttattt 6420  
aggggagatc agctggggaaag aaacggatgtt gtcacttgc gactgttattt tttaggtggc 6480  
gggcccgtaa atcacaccta ttacgggttgc gtcacttgc gactgttattt tttaggtggc 6540  
gtcatccctg agcaggggggg ccacttcgtt aagcatgtcc ctgacttcgc tgcacttgc 6600  
gaccaatcc gccagaagcc gtcggccgc gtcacttgc gactgttattt tttaggtggc 6660

gtttttcaac ggtttgagac cgtccgcccgt aggcatgctt ttgagcggtt gaccäääcgag	6720
ttccaggcgg tcccacagct cggtcacctg ctctacggca tctcgatcca gcatatctcc	6780
tcgtttcgcg ggttggggcg gctttcgctg tacggcagta gtcggtgctc gtccägäcgä	6840
gccagggtca tgcctttcca cgggcccagg gtcctcgta gcgtägtctg ggtcacggtg	6900
aagggggtcg ctcggggctg cgcgctggcc aggggtcgct tgaggctggt cctgctggtg	6960
ctgaagcgct gcccgtctt gcccgtcg gtcggccagg agcatttgac catgggtgtca	7020
tagtccagcc cctccgcccgt gttggccctt ggcgcgcagct tgcccttggaa ggaggcccg	7080
cacgaggggc agtgcagact tttgagggcg tagagcttgg ggcgcgagaaa taccgattcc	7140
ggggagtagg catccgcgcg gcaggccccg cagacggctc cgcattccac gagccaggtg	7200
agctctggcc gttcggggtc aaaaaccagg tttccccat gctttttgtat gcgtttctta	7260
cctctgggtt ccatgagccg gtgtccacgc tcgggtgacga aaaggctgtc cgtgtcccgg	7320
tatacagact ttagagggct gtcctcgacc gatggccctt agagccttca acccagttcag	7380
ctccttcggg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg ttttttttat	7440
catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc gctctgggtc attttcggcg aggaccgctt	7500
tcgctggagc ggcacgtatga tcggcctgtc gcttgcggta ttcggaaatct tgcacgcctt	7560
cgctcaagcc ttctgtcaactg gtcggccac caaacgttcc ggcgagaagc aggccattat	7620
cgccggcatg gcccggcagc cgctggctg cgttgcgtc ggcgttcgcg cgcgaggctg	7680
gatggccctt cccattatga ttcttcgcg ttccggcggc atcgggatgc cgcgttgca	7740
ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga ccatcaggga cagcttcaag gatcgctcgc	7800
ggctcttacc agcctaactt cgatcaactgg accgctgtatc gtcacggcga ttatgcccgc	7860
ctcggcgagc acatgaaacg gttggcatg gattgttaggc gccccttat accttgcgt	7920
cctcccccg ttcgtcgct gtcgttggag ccggggccacc tcgacactgaa tggaagccgg	7980
cggcaccccg ctaacggatt caccactcca agaattggag ccaatcaatt ttgcggaga	8040
actgtgaatg cgccaaaccaa cccttggcag aacatatcca tcggtccgc catctccagc	8100
agccgcacgc ggcgcacatc gggcagcgtt gggctctggc cacgggtgcg catgatcgt	8160
ctccctgtcgt tgaggaccccg gctaggctgg cgggggttggc ttactggta gcagaatgaa	8220
tcaccgatac gcgagcgaac gtgaagcgac tgctgctgca aaacgtctgc gacctgagca	8280
acaacatgaa tggcttcgg tttccgtt gtcgtaaatgc tggaaacgcg gaagtcagcg	8340
ccctgcacca ttatgttccg gatctgcattc gcaggatgt gctggctacc ctgtggaaaca	8400
cctacatctg tattaacgaa ggcgttgcatt gtcaccctgag tgattttct ctggtcccgc	8460
cgcatccata cggccaggtt ttacccatca caacgttcca gtaaccggc atgttcatca	8520
tcagtaaccc gtatcgtag catccctct cgttgcattc gtatcattac cccatgaac	8580
agaaaattccc ctttacacgg aggcatcaag tgaccaaaca gaaaaaaaacc gcccttaaca	8640
tggcccgctt tatcagaagc cagacattaa cgcttctgga gaaactcaac gagctggacg	8700
cgatgaaca ggcagacatc tgcgtatcgc ttacacgacca cgctgtatgag ctttaccgca	8760
gctgcctcgc ggtttcggt gatgacgggt aaaacctctg acacatgcg cttccggaga	8820
cggtcacacgc ttgtctgtaa gcggtgccc ggacggacaca agccgtcag ggcgcgtcag	8880
cggtgttgg cgggtgtcg ggcgcagcca tgacccagtc acgtacgtatc agcggagtgt	8940
atactggctt aactatgcgg catcagacgca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg	9000
tgaaaataccg cacagatcgca taaggagaaa ataccgcattc aggacgttcc cccgcttc	9060
gctcaactgac tcgctgcgtc cggcttgcg gtcgtccgca ggcgttatcgt ctcaactaaa	9120
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgcg gaaaaagaaca tgcgtacaaa	9180
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcgtt ctggcggtt tccataggct	9240
ccgccccccct gacgagcattc aaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac	9300
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaaagctcc ctcgtgcgt ctccctgttcc	9360
gaccctgccc ctaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc	9420
tcaatgctca cgctgttaggt atctcagttc ggtgttaggtc gttcgctcca agctggctg	9480
tgtgcacgaa ccccccgttc agcccggaccg ctgcgcctt tccggtaact atcgcttgc	9540
gtccaaccccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag	9600
cagagcggagg tatgttaggc gtcgtacaga gttcttgaag tggggccta actacgcta	9660
cactagaagg acagtatttg gtatcgtagc tctgtcttgg ccagttaccc tcggaaaaag	9720
agttggtagc tcttgcattcc gaaaacaaac caccgttggt acgggtgggt tttttgttttgc	9780
caagcagcag attacgcgcg gaaaaaaagg atctcaagaa gatcccttgc tcttttctac	9840
ggggctgtac gtcgtatggc acgaaaactc acgtttaaggg attttgcgtca tgagattatc	9900
aaaaaggatc ttccatccat tccctttaaa taaaaatga agtttaat caatctaaag	9960
tatataatgag taaacttggt ctgacatgtt ccaatgttta atcgttgcagg cacctatctc	10020
agcgatctgt ctatccgtt catccatagt tgcctgcattc cccgtcggt agataactac	10080
gatacggag ggcgttaccat ctggcccccgg tgctgtatcgtt ataccgcgag accccacgctc	10140
accggctcca gatttatcg caataaaacca gcccggcggaa agggccgagc gcagaagtgg	10200
tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccggaaag ctagagtaag	10260
tagtgcacca gttaatagtt tgcgtacgt tggttgcatt gtcgtggcgtc	10320

acgctcgctcg	tttggtatgg	cttcatttcag	ctccggttcc	caacgatcaá	ggcgagttac	10380
atgatcccccc	atgttgcgca	aaaaagcggt	tagctccttc	ggtcctccga	tcgttgcag	10440
áagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	ggttátggca	gcactgcata	attctcttac	10500
tgtcatgcca	tccgtaaat	gctttctgt	gactggtgag	tactcaacca	agtcattctg	10560
agaatagtgt	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccggcg	tcaacacggg	ataataccgc	10620
gccacatagc	agaactttaa	aagtgcgtat	cattggaaaa	cgttttcg	ggcggaaaact	10680
ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccaactcg	caccacaactg	10740
atcttcagca	tctttactt	tcaccagcg	ttctgggtga	gcaaaaacag	gaaggcggaaa	10800
tgccgcaaaa	aagggaataa	gggcgacacg	gaaatgttga	ataactcatac	tcttccttt	10860
tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta	ttgtctcatg	agcgatatac	tatttgaaatg	10920
tattnagaaa	aataaaacaaa	taggggttcc	gcmcacat	ccccggaaaag	tgccacactg	10980
cgtctaagaa	accattatta	tcatgacatt	aacctataaa	aataggcgta	tcacgaggcc	11040
ctttcgctt	caagaattct	tatcatgaca	ttaacctata	aaaataggcg	tatcacgagg	11100
cccttcgtc	atcatcaata	atataccta	tttggattt	aagccaat	gataatgagg	11160
gggtggagtt	tgtgacgtgg	cgcggggcg	gggaacgggg	cgggtgacgt	agtagtgtgg	11220
cggaaagtgt	atgttgcag	tgtggcgaa	cacatgtaa	cgcggatgt	gtaaaagtg	11280
acgttttgg	tgtgcgcccgg	tgtatacggg	aagtgacaat	tttcgcgcgg	ttttaggcgg	11340
atgttgttagt	aaatttgggc	gtaaccaagt	aatgtttggc	catttcgcgc	ggaaaactga	11400
ataagaggaa	gtgaaatctg	aataattctg	tgtaactcat	agcgcgtaat	atttgcgtag	11460
ggccgcgggg	actttgaccg	tttacgtgga	gactcgccca	ggtttttc	tcaggtgttt	11520
tccgcgttcc	gggtcaaaat	tggcggttta	ttattatagt	cagctctag		11569

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 11458

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r.mscIL-12 zur regulierten Expression des murinen IL-12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (327)..(713)

&lt;223&gt; VP16

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (714)..(1352)

&lt;223&gt; TetR

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

&lt;222&gt; (1353)..(1912)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1864)..(1902)

&lt;223&gt; TK-min

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; protein\_bind

&lt;222&gt; (1913)..(2212)

&lt;223&gt; TetO7

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

<222> (2213)..(2687)  
 <223> CMV-min + Intron

<220>  
 <221> promoter  
 <222> (2226)..(2264)  
 <223> CMV-min

<220>  
 <221> gene  
 <222> (2688)..(4325)  
 <223> Murines single-chain IL-12

<400> 2

ctgctgggtt	tttccgcctc	agaaggccata	gagcccacccg	catccccagg	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctccccc	cttgctgtcc	tgccccaccc	caccccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaggac	agtggggagt	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gaggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcacatcg	360
gtaaacatct	gctcaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgttaggg	ggcggagtcg	420
tgggggttaa	atcccgacc	cggggaaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcattgcgc	catcggccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgcccccc	540
aggctgacat	cggtcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccgc	ggggagaaaag	600
gacaggcgcg	gagccgcccag	ccccgcctct	tcggggggcgt	cgtcgccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gttaattgttt	ttagtacgcg	cgcgctgtta	cgcgaccca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaatccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtataaa	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgtcttg	atcttccaaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcat	ataatgcatt	ctctagtgaa	960
aaaccttgtt	ggcataaaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttctatactg	tttttctgtta	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	ttttgtccca	tcgcgtatgc	tttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagcttccc	cttctaaagg	gaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaaccat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgcttaca	cctagcttct	gggcgagttt	acgggttgg	1260
aaaccttcga	ttccgaccc	attaagcagc	tctaattgcgc	tgttaatcac	tttactttta	1320
tctaattctag	agggtctgg	tctcttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccggttgg	acctggag	ggacacctgt	ggagagaaaag	gaaaagtgg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaaggctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaagatt	gtctttctg	accagatgg	cgccggccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatacct	cctcggtttt	gaaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620
gccccgtttt	gagagggagt	actcaccctca	acagtcgaga	ggtttccga	tccggtcgat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cggtggcgg	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tgaaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgcgt	ggtcgctcg	tgtcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtgg	1860
cctcgaccg	cgccgcccc	actgcattcg	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcactttct	ctatcaactga	tagggagtgg	taaactcgac	tttcaactttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	gttaaaactcg	actttcaact	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaact	2040
cgacttccac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	actttctct	2100
atcaactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcactttct	ctatcaactga	tagggagtgg	2160
taaactcgac	tttcaactttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggaggccct	tataaggcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	2280
gatcgccctgg	agacgccatc	cacgcgtttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaaat	tgcgaagctt	tattcggtt	gtttatcaca	gttaaaattgc	2400
taacgcgtc	agtgcgttctg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	gttggtcgt	2460
aggcactggg	caggtaaatg	tcaaggttac	aagacagggtt	taaggagacc	aatagaaaact	2520
gggcttgcgt	agacagagaaa	gacttgcg	tttctgatag	gcacctattt	gtcttactga	2580
catccactt	gcctttctct	ccacagggtt	ccactccctt	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagactact	taatacgact	cactataggc	tagcctcgag	aattcgaatg	gccatggtc	2700
ctcagaagct	aaccatctcc	tggtttgcca	tcgttttgct	ggtgtctcca	ctcatggcca	2760
tgtggagct	ggagaaagac	gtttatgttg	tagaggtgga	ctggactccc	gatccccctg	2820

gagaaacagt	gaacctcacc	tgtgacacgc	ctgaagaaga	tgacatcacc	tggacctcag	2880
accagagaca	tggagtcata	ggctctggaa	agaccctgac	catcaactgtc	aaagagttc	2940
tagatgctgg	ccagtacacc	tgccacaaag	gaggcgagac	tctgagccac	tcacatctgc	3000
tgctccacaa	gaaggaaaat	ggaatttgtt	ccactgaaat	tttaaaaaat	ttcaaaaaca	3060
agactttcct	gaagtgtgaa	gcaccaaatt	actccggacg	gttacgtgc	tcatggctgg	3120
tgcaaagaaa	catggacttg	aagttcaaca	tcaagagcag	tagcagttcc	cctgactctc	3180
gggcagtgac	atgtgaaatg	gcgtctctgt	ctgcagagaa	ggtcacactg	gaccggaaagg	3240
actatgagaa	gtattcagtg	tcctgccagg	aggatgtcac	ctgccaact	gccggaggaga	3300
ccctgcccatt	tgaactggcg	ttggaagcac	gpcagcagaa	taaatatgag	aactacagca	3360
ccagcttctt	catcagggac	atcatcaaacc	cagacccccc	caagaacttg	cagatgaagc	3420
ctttaaagaaa	ctcacaggtg	gaggtcagct	gggagtagccc	tgactcctgg	agcactcccc	3480
attcctactt	ctccctcaag	ttctttgttc	gaatccagcg	caagaaaagaa	aagatgaagg	3540
agacagagga	gggggtgtaac	cagaaggtg	cgttcctctgt	agagaagaca	tctaccgaag	3600
tccaaatgcaa	aggcgggaaat	gtctgcgtgc	aagctcagga	tcgttattac	aattcctcat	3660
gcagcaagtg	ggcatgtgtt	ccctgcagg	tccgatccgg	tggcggtggc	tccggcggtg	3720
gtgggtcggt	tggcgcggt	tcttaggtca	ttccagtctc	tggacctgccc	aggtgtctta	3780
gccagtcctt	aaacctgtctg	aagaccacag	atgacatgtt	gaagacggcc	agagaaaaac	3840
tgaaacattt	ttcctgcact	gctgaagaca	tcgatcatga	agacatcaca	cgggaccaaa	3900
ccagcacatt	gaagacctgt	ttaccactgg	aactacacaa	gaacggaggt	tgcctggcta	3960
ctagagagac	ttcttccaca	acaagaggaa	gctgcctgccc	cccacagaag	acgtcttga	4020
tgatgaccct	gtgccttgggt	agcatctatg	aggacttggaa	gatgtaccag	acagagttcc	4080
aggccatcaa	cgcagcactt	cagaatcaca	accatcagca	gatcattcta	gacaaggcga	4140
tgctggggc	catcgatgag	ctgatgcagt	ctctgaatca	taatggcgag	actctgcgcc	4200
agaaacccctt	tgtggggagaa	gcagaccctt	acagagtggaa	aatgaagctc	tgcattctgc	4260
ttcacgcctt	cagcaccggc	gtcgtgacca	tcaacagggt	gatgggctat	ctgagctccg	4320
cctgagaatt	gatccggatt	agtccattt	gtttaaagaca	ggatggggcc	tatatatggaa	4380
tccactagta	acggccggca	gtgtgctggaa	attctgcaga	tatccatcac	actggcgccc	4440
gctcgagcat	gcatcttagag	ggcccttattc	tatagtgtca	cctaaatgt	agagctcgct	4500
gatcagccctc	gactgtgcct	tctagttgcc	agccatctgt	tgtttggccc	tcccccgtgc	4560
cttccttgac	ccttggaggt	gccactccca	ctgtccttcc	ctaataaaat	gaggaaattt	4620
catcgattt	tctgagtagg	tgtcattcta	ttctgggggg	tgggggtgggg	caggacagca	4680
agggggagga	tttgggagac	aatagcaggc	atgctggggaa	tgcgggtggc	tctatggctt	4740
ctgaggcggt	aagaaccagt	cgacatcgat	gctagagttgg	aagggtctga	ggtacgatga	4800
gaccgcacc	aggtgcagac	cctgcgagtg	tggcggttaaa	cataattagga	accagctgt	4860
gatgctggat	gtgaccggagg	agctgaggcc	cgatcacttg	gtgctggcct	gcacccgcgc	4920
tgagtttggc	tctagcgatg	aagatacaga	tttaggtact	gaaatgtgt	ggcgtggctt	4980
aagggtggga	aagaatataat	aagggtgggg	tcttatgttag	ttttgtatct	gttttgac	5040
agccgcgcgc	gcacatgagca	ccaactcggtt	tgatggaaagc	attgtgagct	catatttgac	5100
aacgcgcatg	ccccccatggg	ccgggggtgcg	tcagaatgtg	atgggctcca	gcattgatgg	5160
tcgccccgtc	ctgcccccaa	actctactac	tttgacctac	gagaccgtgt	ctggaaacgcc	5220
gttggagact	gcagccctccg	ccgcccgttc	agccgtcgca	gccaccggccc	gcgggattgt	5280
gactgacttt	gttttcttgc	gccccgttgc	aagcagtgc	gcttcccgtt	catccggccg	5340
cgatgacaag	ttgacggctc	ttttggcaca	attggattct	ttgaccgggg	aacttaatgt	5400
cgtttctcag	cagctgttgg	atctgcgcca	gcaggtttct	gccctgaagg	cttcctcccc	5460
tcccaatgca	gtttaaaaaca	taaataaaaa	accagactct	gtttggattt	ggatcaagca	5520
agtgtcttgc	tgtctttttt	taggggtttt	gwgcgcgcg	tagggccggg	accagcggtc	5580
tcgggtcggt	agggtctgt	gtatttttc	caggacgtgg	taaaggtgac	tctggatgtt	5640
cagatacatg	ggcataagcc	cgtctctggg	gtggaggttag	caccactgca	gagcttcatg	5700
ctgccccgtg	gtgttgtaga	tgatccagtc	gtacgaggag	cgctgggcgt	ggtgcctaaa	5760
aatgtcttgc	atagcaagc	tgatttgcag	gggcaggcccc	ttgggtgtaa	tgtttacaaa	5820
gcgggttaagc	tgggatgggt	gcatacggt	ggatgttggaa	tgcatttttt	actgtatattt	5880
tagttggct	atgttcccaag	ccatattccct	ccggggattt	atgttgcgca	gaaccaccag	5940
cacagtgtat	ccgggtgcact	tggaaattt	gtcatgtac	ttagaaggaa	atgcgtggaa	6000
gaacttggag	acgccccttgc	gaccccaag	attttccat	cattcgatca	taatgtatggc	6060
aatggggccca	cggggcgccgg	cctggggcgaa	gatatttctg	ggatcaactaa	cgtcatagtt	6120
gtgttccagg	atgagatcg	cataggccat	ttttacaag	cgccggcgga	gggtgcggaga	6180
ctgccccgtata	atgggtccat	ccggcccagg	ggcgttagtt	ccctcacaga	tttgcatttc	6240
ccacgccttgc	agttcagatg	gggggatcat	gtctacgtc	ggggcgatga	agaaaaacggt	6300
ttccgggttgc	ggggagatca	gctgggaaga	aagcaggttc	ctgagcagct	gcgacttacc	6360
gcagccgggtg	ggcccgtaaa	tcacacccat	taccgggtgc	aactggtagt	taagagagct	6420
gcagctggcg	tcatccctga	gcaggggggc	cactcgatca	agcatgtccc	tgactcgcat	6480

gtttccctg	accaaatccg	ccagaaggcg	ctcgccgccc	agcgatagca	gttcttgc	6540
ggaagcaaag	ttttcaacg	gttgagacc	gtccgcccgt	ggcatgctt	tgagcg	6600
accaagcagt	tccaggcggt	cccacagctc	ggtcacactgc	tctacggcat	ctcgatccag	6660
cataatctcct	cgtttcgcgg	gttggggcgg	cttcgcgtt	acggcagtag	tcgggtctcg	6720
tccagacggg	ccagggtcat	gtcttccac	gggcgcaggg	tcctcgtag	cgtagtctgg	6780
gtcacggta	aggggtgcgc	tccggctgc	gchgctggcca	gggtgcgtt	gaggctggtc	6840
ctgctggtgc	tgaagcgctg	ccggcttcg	ccctgcgcgt	cggcaggta	gcatttgacc	6900
atgggtcat	agtccagccc	ctccgcggc	tggcccttgg	cgcgagctt	gcccctggag	6960
gaggcgcgc	acgaggggca	gtcagactt	ttgagggcgt	agagcttggg	cgcgagaaat	7020
accgattccg	gggagtaggc	atccgcgcg	caggccccgc	agacggctc	gcattccacg	7080
agccaggtga	gctctggccg	ttcgggtca	aaaaccagt	ttccccatg	cttttgatg	7140
cgtttcttac	ctctggttt	catgagccgg	tgtccacgct	cggtgacgaa	aaggctgtcc	7200
gtgtccccgt	atacagactt	gagaggcctg	tcctcgaccc	atgccttga	gagccttcaa	7260
cccagtcac	tccttccgg	gggcgcgggg	catgactatc	gtcggccgac	ttatqactgt	7320
cttcttatac	atgcaactcg	taggacaggt	gccggcagcg	ctctgggtca	ttttcggcga	7380
ggaccgcgtt	cgctggagcg	cgacgatgt	cggcctgtcg	cttgcggtat	tcggatctt	7440
gcacgcgc	gctcaagcct	tcgtcactgg	tcccgcacc	aaacgttgc	gcgagaagca	7500
ggccattatc	gccggcatgg	cggccgacgc	gctgggctac	gtctgctgg	cggtcgcac	7560
gcgaggctgg	atggccttcc	ccattatgt	tcttcgcgt	tccggcggca	tcgggatgcc	7620
cgcggtcag	gccatgctgt	ccaggcagg	agatgacgac	catcagggac	agcttcaagg	7680
atcgctcgc	gctttacca	gcctaacttc	gatcaactg	ccgctgatcg	tcacggcgat	7740
ttatgcgc	tcggcgagca	catggAACGG	tttggcatgg	atttaggcg	cgccctata	7800
ccttgcgtc	ctccccgcgt	tgcgtcg	tgcgtggagc	cgggccac	cgacactgaa	7860
ggaagccggc	ggcacctcgc	taacgattc	accactccaa	gaattggagc	caatcaattc	7920
ttgcggagaa	ctgtgaatgc	gcaaaaccac	ccttggcaga	acatatccat	cgcgccgccc	7980
atctccagca	gccgcacgc	gchgcatctc	ggcagcgttg	ggtcttgc	acgggtgcgc	8040
atgatcg	tccgtcg	gaggacccgg	ctaggctgg	ggggttgc	tactggtag	8100
cagaatgaat	caccgatac	cgagcgaac	tgaagcgact	gctgtc	aacgtctgc	8160
acctgagca	caacatgaat	ggtctcggt	ttccgtgtt	cgtaaagtct	ggaaacgcgg	8220
aagtca	cctgcacat	tatgtccgg	atctgcatcg	caggatgctg	ctggctaccc	8280
tgtggAACAC	ctacatctgt	attaacgaa	cgctggcatt	gaccctgagt	gatttttctc	8340
ttgtcccgcc	gcatccatac	cgccagttgt	ttaccctc	aacgttcc	taaccggca	8400
tgttcatcat	cagtaaccc	tatcgtagc	atctcttc	gttcatcg	tatcattacc	8460
cccatgaa	gaaattcccc	tttacacgg	ggcatca	gacc	aaaaaacgg	8520
cccttaacat	ggcccgctt	atcagaagcc	agacat	tttgc	aaactcaacg	8580
agctggacgc	ggatgaacag	gcagacat	gtgaatcg	tcacgacc	gctgtgagc	8640
tttaccgcag	ctgcctcg	cggttgcgt	atgacgg	aaac	cacatgcac	8700
tcccgagac	ggtcacag	tgtctgt	ggatgccc	gagc	ccccgtcagg	8760
gchggtc	gggtgttgg	gggtgtc	gchgaccc	gacc	cgtagcgata	8820
gcccggatgt	tactggctt	actatgc	atcagag	attgtactg	gagtgcacca	8880
tatgcgtgt	gaaataccgc	acagatgc	aaggagaaaa	taccgc	ggcgtcttc	8940
cgcttcctcg	ctcaactgact	cgctgc	ggtgc	tttgc	cggtatcagc	9000
tcactcaa	gcccgtat	ggttatcc	agaatcagg	gataacgc	gaaagaacat	9060
gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccagg	ccgtaaaa	ggccgttgc	ttggcgtttt	9120
ccataggctc	cgccccctgt	acgagcat	caaaaatcg	cgctca	agagggtggcg	9180
aaacccgaca	ggactataaa	gataccagg	gttccccct	ggaagctcc	tcgtgc	9240
tcctgttcc	accctgc	ttaccgg	ctgtcc	tttccctt	cggttac	9300
ggcgcttct	caatgctc	gtgttag	tctc	gtgttag	ttcgcttcaa	9360
gctgggtgt	gtgcacgaa	ccccgttca	ggccgaccc	tgcc	ccggtaacta	9420
tcgtcttgc	tccaacccgg	taagacacg	ttatgc	ctggc	ccactgtaa	9480
caggattagc	agagcgag	atgtagg	tgctac	tttgc	ggtggctaa	9540
ctacggctac	actagaagg	cgtat	tatcg	ctg	cagttac	9600
cgaaaaa	gttggtag	tttgc	caaaca	accg	cggtgtt	9660
ttttgttgc	aagcagcaga	ttacgc	aaaaagg	tctca	atccttgc	9720
ctttctacg	gggtctg	ctc	ggaa	cgta	ttttggc	9780
gagattatca	aaaaggatct	tcac	ctttaa	gggg	tttttaa	9840
aatctaa	atata	tgac	aaaaatg	tttt	tcagtgagg	9900
acctatctca	gcgatctgc	tat	tttttt	gctgact	ccgtcg	9960
gataactacg	atacgggagg	tttaccatc	tttttttt	gctgca	taccgc	10020
cccacgtca	ccggctccag	attatc	aaaaacc	ccagccgg	ggccgc	10080
cagaagtgt	cctgcaact	tatcc	gggg	tttttttt	gcccggaa	10140

tagagtaagt	agttcgccag	ttaatagttt	gchgcaacgtt	gttggcattt	ctgcaggcat	10200
cgtgggtgtca	cgctcgtcgt	ttggatggc	ttcattcagc	tccgggttccc	aacgatcäag	10260
gcgagttaca	tgatccccca	tgttgc当地	aaaagcggtt	agctccctcg	gtcctccgat	10320
cgttgc当地	agtaagttgg	ccgcagtgtt	atcactcatg	gttatggc当地	cactgcataa	10380
ttctcttact	gtcatgccat	ccgtaaagatg	cttttctgtg	actgtgtgag	actcaaccaa	10440
gtcattctga	gaatagtgtt	tgccggc当地	gagttgctt	tgccggc当地	caacacggga	10500
taataccgcg	ccacatagca	gaactttaaa	agtgtctatc	attggaaaac	gttcttc当地	10560
gcgaaaactc	tcaaggatct	taccgc当地	gagatccagt	tcgatgttac	ccactcgtgc	10620
acccaactga	tcttcagcat	cttttacttt	caccagc当地	tctgggttag	caaaaacagg	10680
aaggcaaaat	gccgcaaaaa	agggataaag	ggcgacacgg	aatatgttga	tactcataact	10740
cttcctttt	caatatttt	gaagcattt	tcagggttat	tgttc当地	gcggatacat	10800
atttgaatgt	atttagaaaa	ataaaacaaaat	aggggttccc	cgcacattt	cccgaaaagt	10860
gccacctgac	gtctaaagaaa	ccatttattat	catgacat	acctataaaa	ataggcgtat	10920
cacgaggccc	tttcgtctt	aagaatttctt	atcatgacat	taacctataa	aaatäggcgt	10980
atcacgaggc	ccttcgtca	tcatcaataa	tataccttat	tttggatttga	agccaatatg	11040
ataatgaggg	ggtggagttt	gtgacgtggc	gcggggc当地	ggaacggggc	gggtgacgta	11100
gtagtgtggc	ggaagtgtt	tgttgc当地	gtggc当地	acatgttac	gccggatgt	11160
gtaaaagtga	cgtttttgtt	gtgc当地	gtatacggga	agtgacaatt	tgc当地	11220
tttaggc当地	tgttgc当地	aatttggc当地	taaccaagta	atgttggcc	atttc当地	11280
gaaaactgaa	taagagggaa	tgaaatctt	ataattctgt	gttactcata	gcgc当地	11340
tttgtcttagg	gccgc当地	cttgc当地	ttacgtggag	actcgccc当地	gtgtt当地	11400
caggtgtttt	ccgc当地	ggtcaaaagtt	ggc当地	tattatagtc	agctctag	11458

```

<210> 3
<211> 11453
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Adenovirales Expressionsplasmid pShuttle.3r.hscIL-12 zur
      regulierten Expression des humanen IL-12 nach Virusgeneration
      mittels AdEasy

<220>
<221> gene
<222> (327) .. (713)
<223> VP16

<220>
<221> gene
<222> (714) .. (1352)
<223> TetR

<220>
<221> Intron
<222> (1353) .. (1912)
<223>

<220>
<221> promoter
<222> (1864) .. (1902)
<223> TK-min

<220>
<221> protein_bind
<222> (1913) .. (2212)
<223> TetO7

<220>
<221> misc_feature

```

<222> (2213)..(2709)  
 <223> CMV-min + Intron

<220>  
 <221> promoter  
 <222> (2226)..(2264)  
 <223> CMV-min  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> (2710)..(4308)  
 <223> Humanes singe-chain IL-12

<220>  
 <221> mutation  
 <222> (4020)..(4023)  
 <223> T/C, A/T, G/C, T/G

<400> 3

ctgctgggttc	tttccgcctc	agaaggccata	gagcccaccc	catccccagc	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatccttccc	cttgctgtcc	tgccccaccc	caccccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gaggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccttctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcatcg	360
gtaaacatct	gctcaaactc	gaagtggcc	atatccagag	cgcctgtaggg	ggcggagtcg	420
tgggggtaa	atcccgagcc	cggggaaatcc	cggtccccca	acatgtccag	atcgaaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgcccccc	540
aggctgacat	cggtcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtccgc	ggggagaaaag	600
gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggggcgt	cgtcgtccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttctgtacgcg	cgcggctgt	cgcggaccca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaatccg	catatgatca	atccaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttgggt	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtataaa	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgtcttg	atcttccaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcatt	ataatgcatt	ctctagtgaa	960
aaaccttgtt	ggcataaaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcataactg	tttttctgt	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	ttttgctcca	tcgcatgac	tttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagtttccc	cttctaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatggtgc	tatctaacat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaaagccc	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgttagg	ctgctctaca	cctagcttct	ggggaggtt	acgggttgtt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaatgcgc	tgttaatcac	tttactttta	1320
tctaatctag	agggtctggg	tctcttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgcggccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccgggtgg	acctggag	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtgg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagccctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtctttctg	accagatgga	cgcggccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatactt	cctcgaaaa	gaaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620
gcccccttt	gagagggagt	actccccca	acagtcgaga	ggtttccga	tccggtecat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cggtggcgg	gtaccgttcg	gaggcccacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaaagagcc	gcaagagtt	tgtctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgatg	ggtcgctcgg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	accttaat	gcaagtgga	1860
cctcggaccg	cgccgcccc	actgcattctg	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaactcgac	tttactttt	ctctatcact	1980
gataggggagt	ggtaaactcg	actttactt	ttctctatca	ctgataggg	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
atcactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaactcgcac	tttcactttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggaggccct	tataagcaga	gctcgatgg	tgaaccgtca	2280
gatcgcttgg	agacgccatc	cacgcgtttt	tgacccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggcccccgaat	tgcgaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgcctctg	acacaacagt	ctcgaactt	agctgcagaa	gttggtcgtg	2460
aggcactggg	caggtaagta	tcaagttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgcg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattt	gtcttactga	2580

catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgaact	cactataggc	tagcctcgag	aattcacgcg	tggtaccgag	2700
ctcgatcca	tgggtcacca	gcagttggc	atctcttgg	tttccctgg	tttctgc	2760
tctccctcg	tggccatatg	ggaactgaag	aaagatgtt	atgtcgtaga	attggattgg	2820
tatccggatg	cccctggaga	aatgggtggc	ctcacctgt	acaccctga	agaagatgg	2880
atcacctgga	ccttggacca	gagcagttag	gtcttaggt	ctggcaaaac	cctgaccatc	2940
caagtcaaag	agtttggaga	tgctggccag	tacacctgt	acaaaggagg	cgaggttcta	3000
agccattcgc	tcctgctgct	tcacaaaaag	gaagatggaa	tttggtccac	tgatattta	3060
aaggaccaga	aagaacccaa	aaataagacc	tttctaagat	gcgaggccaa	gaattattct	3120
ggacgttca	cctgctgggt	gctgacgaca	atcagtaact	atggacatt	cagtgtcaaa	3180
agcagcagag	gctcttctga	cccccaagg	gtgacgtgc	gagctgctac	actctctgca	3240
gagagagtca	gaggggacaa	caaggagtt	gagtaact	tggagtgc	ggaggacagt	3300
gcctgcccag	ctgctgagga	gagtctgccc	attgaggta	tggggatgc	cgttcacaag	3360
ctcaagtatg	aaaactacac	cagcagcttc	ttcatcagg	acatcatcaa	acctgacc	3420
cccaacaact	tgcagctgaa	gccattaaag	aattctcg	aggtggaggt	cagctggag	3480
taccctgaca	cctggagtac	tccacattc	tacttctcc	tgacattct	cgttcagg	3540
cagggcaaga	gcaagagaga	aaagaaagat	agagtcttca	cgacaagac	ctcagccac	3600
gtcatctgcc	gcaaaaatgc	cagcattag	gtgcgggccc	aggaccg	ctatagctca	3660
tcttggagcg	aatgggc	tgtccctgc	agtggggc	gtggggc	atctagaaac	3720
ctccccgtgg	ccactccaga	cccagaatg	ttcccatg	ttcaccact	ccaaaactg	3780
ctgagggccg	tcagcaacat	gctccagaag	gccagacaaa	ctctagaatt	ttacccttgc	3840
acttctgaa	agattgatca	tgaagatata	acaaaagata	aaaccag	agtggagg	3900
tgttaccat	tggaattaa	caagaatg	agttgc	attccagaga	gacctctt	3960
ataactaatg	ggagttgc	ggc	ttccat	ttatgatgc	cctgtcc	4020
tcgagtattt	atgaagactc	gaagatgt	cagg	tcaagaccat	aatgca	4080
tttctgatgg	atcctaagag	gcagatctt	ctagatcaa	acatgct	agttattgat	4140
gagctgatgc	aggccctgaa	tttcaacagt	gagactgt	cacaaaatc	ctccctt	4200
gaaccggatt	tttataaaac	taaaatcaag	ctctgcata	tttctcat	tttcagaatt	4260
cgggcagtga	ctattgatag	agtgtg	tatctgat	tttctt	agcgagg	4320
atccggatta	gttcaattt	ttaaagacag	gatatcag	gtccagg	tagttt	4380
tcaacaat	caccagctg	agcctataga	gtacgag	ccat	aaaagattt	4440
atttagctc	cagaaaaagg	gggaaatg	agacccc	tgtag	gcaagct	4500
aacggccg	agtgtgct	aattctgc	atatccat	ca	cgctcg	4560
tgcatctaga	ggccctt	ctata	ac	tag	tgatcag	4620
cgactgtg	ttctagtt	cagccat	ttt	ctcc	ctccctt	4680
ccctggaa	tgccact	actgt	ctt	cc	ccat	4740
gtctgagtag	gtgtcattt	attctgg	gtgggt	gcagg	aagg	4800
attggaa	caatagc	catgtgg	atgcgt	g	tttgc	4860
aaagaacc	tcgactcg	gatctgg	tggtt	aa	ttataagg	4920
gggggtctt	tgtagttt	tatctt	gcag	ccg	ccat	4980
tcgtttgat	gaagcattt	gagct	ttt	gcat	gacca	5040
gtgcgtcaga	atgtatgg	ctccag	atgt	cccc	atggcc	5100
actacctg	cctacgag	ctgt	atgt	ccgt	ccgca	5160
gtttcagcc	ctgcagcc	ccccc	ccgt	cc	cc	5220
cttgc	gtgcag	ccgtt	ccgc	ccat	cc	5280
gcacaattt	attttt	ccgg	ccgt	ccgt	cc	5340
cgccagc	tttct	gaagg	cc	ccgt	cc	5400
aaaaaacc	actctgtt	ttt	cc	ccgt	cc	5460
gttttgc	cgccgt	ccgg	ccgt	ccgt	cc	5520
ttttcc	cggtt	atgt	atgt	ccat	cc	5580
ctgggg	atgt	ccat	atgt	ccat	cc	5640
ctgggg	atgt	ccat	atgt	ccat	cc	5700
cagt	aggagc	ccgt	ccgt	ccat	cc	5760
gccagg	ggcc	atgt	atgt	ccat	cc	5820
cggtt	atgt	ccat	atgt	ccat	cc	5880
tccct	atgt	ccat	atgt	ccat	cc	5940
gatt	atgt	ccat	atgt	ccat	cc	6000
aattt	atgt	ccat	atgt	ccat	cc	6060
ccat	atgt	ccat	atgt	ccat	cc	6120
gcaagat	ttct	atgt	atgt	ccat	cc	6180
gccattt	caaagc	ccgt	ccag	act	cc	6240
ccagg	ccgt	atgt	atgt	ccat	cc	

gaagaaaagca ggttcctgag cagctgcac ttaccgcagc cggtggggcc gtaaaatcacä 6300  
 cctattaccc ggtgcaactg gtagttaaga gagctgcagc tgccgtcatc cctgagcaagg 6360  
 gggggccactt cgtaagcat gtcctgact cgcatgttt ccctgaccaa atccggccaga 6420  
 aggcgctcgc cgccccagcga tagcagttct tgcaaggaag caaagtttt caacggtttg 6480  
 agaccgtccg cctgtaggcat gctttgagc gtttgaccaa gcagttccag gccggtcccac 6540  
 agctcggtca cctgtctcac ggcacatcgat tccagcatat ctcctcggtt cgccgggttgg 6600  
 ggccggcttgc gctgtacggc agtagtcggt gtcgtccag acggggccagg gtcatgttctt 6660  
 tccacggcg cagggtctc gtcagcgtag tctgggtcac ggtgaagggg tgccgtcccg 6720  
 gctgcgcgtt ggccagggtg cgcttgaggc tggtcctgct ggtgctgaag cgctgcccgt 6780  
 cttcggccctg cgctgtccgc aggttagcatt tgaccatggt gtcatagtc agcccccctccg 6840  
 cggcgtggcc ctggcgccg agcttgcct tggaggagggc gccgcacgag gggcagtgca 6900  
 gactttttag ggcgttagagc ttggggcgca gaaataccga ttccggggag taggcattccg 6960  
 cggccgcaggc cccgcagacg gtctgcatt ccacgagcca ggtgagctct ggccgttcgg 7020  
 ggtcaaaaac caggtttccc ccatgtttt tgatgcgtt cttacctctg gtttccatgta 7080  
 gccgggttgc acgctcggtg acgaaaaaggc tggccgtgtc cccgtatata gacttggagag 7140  
 ggagtttaaa cgaattcaat agcttgggtc atggggcgccg atataaaaatg caaggtgctg 7200  
 ctcaaaaaat caggcaaaagc ctcgcgcata aaagaaaagca catcgtagtc atgctcatgc 7260  
 agataaaaggc aggttaagctc cggaaaccacc acagaaaaaaag acaccatttt tctctcaaac 7320  
 atgtctgcgg gtttctgcat aaacacaaaaaaa taaaataaca aaaaaacatt taaacattag 7380  
 aaggcctgtct tacaacagga aaaacaaccc ttataagcat aagacggact acggccatgc 7440  
 cggcgtgacc gtaaaaaaaaac tggtcaccgt gattaaaaaaag caccaccgac agtcctcgg 7500  
 tcatgtccgg agtcataatg taagactcgg taaaacacatc aggttgattc atcgggtcagt 7560  
 gctaaaaagc gaccgaaaata gcccggggga atacataccg gcaggcgttag agacaacatt 7620  
 acagccccca taggaggtat aacaaaattt ataggagaga aaaacacata aacacctgaa 7680  
 aaaccctcct gcctaggcaa aatagcaccct tcccgctcca gaacaacata cagcgttca 7740  
 cagcggcagc ctaacagtca gccttaccag taaaaaaagaa aacctattaa aaaaacacca 7800  
 ctcgacacgg caccagctca atcagtcaca gtgtaaaaaaaaa gggccaagtg cagagcgt 7860  
 atatataggc ctaaaaaatg acgtaacggt taaagtccac aaaaaacacc cagaaaaccg 7920  
 cacgcgaacc tacgcccaga aacgaaagcc aaaaaaccca caacttcctc aaatcgtcac 7980  
 ttccgttttc ccacgttacg taacttccca ttttaagaaaa actacaattc ccaacacata 8040  
 caagttactc cgccctaaaaa cctacgtcac ccgcgggggtt cccacgcccc ggcacacgtc 8100  
 acaaaactcca cccccctcatt atcatattgg cttcaatcca aaataaggta tattattgt 8160  
 gatgttaatt aacatgcatt gatccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgttaagg 8220  
 agaaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct ggcgtcggtc 8280  
 gttcggctgc ggcgagcggt atcagtcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa 8340  
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt 8400  
 aaaaaggccg cggtgctggc gttttccat aggctccggc cccctgacga gcatcacaaa 8460  
 aatcgacgct caagttagag gtggcgaaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt 8520  
 cccctggaa gtccttcgt ggcgtctcct gttccgaccc tgccgttac cggataacctg 8580  
 tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 8640  
 agttcggtgt aggtcggtcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccccc cggtcagccc 8700  
 gaccgctgagc ctttatccgg taactatcg tttgagtccca accccggtaag acacgactta 8760  
 tcgcccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggccgggtct 8820  
 acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaagagacagt atttgggtatc 8880  
 tgcgtctgc tgaagccagt taccttcggg aaaaagatgt gtagctttg atccggcaaaa 8940  
 caaaccaccc ctggtagcgg tggttttt gtttgcacg agcagattac ggcgcagaaaa 9000  
 aaaggatctc aagaagatcc ttgtatctt tctacgggggt ctgacgctca gtggAACGAA 9060  
 aactcactgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac cttagatcctt 9120  
 tttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atagataaac ttgggtctgac 9180  
 agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 9240  
 atagttgcct gactccccgt cgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 9300  
 cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcacccg ctccagattt atcagcaata 9360  
 aaccagccag ccggaaaggcc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc 9420  
 cagtttattt attgttgcgg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagttgcgc 9480  
 aacgttggcc ccattgtcgc agccatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac cttagatcctt 9540  
 ttcacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg 9600  
 gctatctgga caagggaaaaa cgcaagcgcga aagagaaaagc agtagctt cagttgggtt 9660  
 acatggcgat agtagactg ggcgggttta tggacagccaa ggcgcacccggg attgcccagct 9720  
 ggggcggccct ctggtaaggt tggaaagccc tgccaaatgaa actggatggc tttctcgccg 9780  
 ccaaggatct gatggcgccag gggatcaagc tctgtatcaag agacaggatg aggatcggtt 9840  
 cgcacatgattt aacaagatgg attgcacgcgca gtttctccgg cgcgttgggt ggagaggcta 9900

ttcggctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgcccgt	gttccggctg	9960
tcägcgcagg	ggcgccccgt	tcttttgc	aagaccgacc	tgtccggtgc	cctgaatgaa	10020
ctgcäagacg	aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cggcggtcc	ttgcgcägct	10080
gtgctcgacg	ttgtcäctga	agcgggaagg	gactggctc	tattggcga	agtgcgcggg	10140
cäggatctcc	tgtcatctca	ccttgcct	gccgagaaag	tatccatcat	ggctgätgca	10200
atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgccc	tcgaccacca	agcgääacat	10260
cgcacatcgägc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggctt	tcgatcagga	tgatctggäc	10320
gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgc	ggctcaaggc	gagcatgccc	10380
gacggcgagg	atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgt	tgccgaat	atcggtggaa	10440
aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	gccggctgg	gtgtggcgg	ccgctatcag	10500
gacatagcgt	tggttacccg	tgatattgt	gaagagctt	gccccgaat	ggctgaccgc	10560
ttcctcg	tttacggat	cgccgc	gattcgc	gcatgc	ctatgc	10620
cttgcacagt	tcttctgaat	tttggtaaa	ttttgttaa	atcagctcat	tttttaacca	10680
ataggccgaa	atcggcaaca	tcccttataa	atcaaaagaa	tagaccgc	tagggtttag	10740
tgttgttcca	gtttgaaaca	agagtccact	attaaagaac	gtggactcca	acgtcaaagg	10800
gcgaaaaacc	gtctatcagg	gcatggccc	actacgtgaa	ccatcacc	aatcaagtt	10860
tttgcgtcg	aggtgcgt	aagctctaaa	tccgaaccct	aaagggagcc	cccgatttag	10920
agcttgcacgg	ggaaaagccgg	cgaacgtggc	gagaaaggaa	ggaaagaaag	cgaaaggagc	10980
gggcgtttag	gcatggcaa	gtgttagcgt	cacgcgtgc	gtaccacca	cacccgcgc	11040
cttaatgcgc	cgctacagg	cgccattc	gatcgaatt	attcttaa	gttgcgtcg	11100
ttttbtaaca	tcatcaataa	tatacctt	tttggattg	agccaat	ataatggagg	11160
ggtggagtt	gtgacgtggc	gcggggcgt	gaaacggggc	gggtgcgt	gtgtgtggc	11220
ggaagtgtga	tgttgc	gaaac	acatgtaa	gacggatgt	gaaaagtga	11280
cgtttttgt	gtgcgc	gtacacagga	agtgacaatt	ttcgccg	tttaggcgg	11340
tgttgcgt	aaattggcg	taaccgagta	agatttggcc	atttcgcgg	gaaaactgaa	11400
taagaggaag	tgaaaatctga	ataatttgt	gttactcata	gcgctata	ctg	11453

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9784

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r zur regulierten Expression

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (327)..(713)

&lt;223&gt; VP16

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (714)..(1352)

&lt;223&gt; TetR

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

&lt;222&gt; (1353)..(1912)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1864)..(1902)

&lt;223&gt; TK-min

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; protein\_bind

&lt;222&gt; (1913)..(2212)

<223> Tet07

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (2213)..(2709)
<223> CMV-min + Intron
```

```
<220>
<221> promoter
<222> (2226)..(2264)
<223> CMV-min
```

```
<220>
<221> multiple cloning site
<222> (2669)..(2770)
<223> NheI, XhoI, KpnI, BamHI, SpeI, EcoRV, NotI, XhoI
```

<400>	4	60				
ctgctggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagccccaccg	catccccagc	atgcctgcta	120
ttgtctccc	aatcctcccc	cttgcgtgtcc	tgccccaccc	caccccccag	aatagaatga	180
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	agggaaaggac	agtgggagtg	240
gcacccctca	gggtcaagga	aggcacgggg	gagggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	300
gaaggcacag	tgcaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	360
ccctctagga	tgcatacctcg	cgcggccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcacatcg	420
gtaaaacatct	gctcaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgttaggg	ggcggagatcg	480
tgggggttaa	atcccgacc	cggggaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	540
tctagcgcgt	cggcatgcgc	categccacg	tcctgcgcgt	ctaagtggag	ctcgcccccc	600
aggctgacat	cggtcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgttgcgcgc	ggggagaaaag	660
gacaggcgcg	gagccgcccag	ccccgcctct	tcggggggcg	cgtcgccgg	gagatcgagc	720
aggccctcg	tggtagaccc	gtattttgttt	ttcgtacgcg	cgcggctgt	cgcggacc	780
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaattccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	840
gctggctctg	caccttgggt	atcaaataat	tcgatagtt	gtcgtataaa	tggcggcata	900
ctatcaatcg	taggtgtttc	cctttttct	ttagcgactt	gatgtcttt	atcttccaaat	960
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacacgcg	ctgagtgcat	ataatgcatt	ctctagtgaa	1020
aaacctgtt	ggcataaaaaa	ggctaaattga	tttcgagag	tttcataactg	tttttctgt	1080
ggccgtgtac	ctaaatgtac	ttttgcgtcc	tcgcgatgac	ttagtaaagc	acatctaaaa	1140
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagttttccc	tttctaaagg	gcaaaagtga	1200
gtatgggcc	tatctaatacat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaaagcccg	tttatttttt	1260
acatgccaat	acaatgtagg	ctgctctaca	cctagcttct	gggcgagttt	acgggttgtt	1320
aaaccttcga	ttccgacctc	attaaggcgc	tctaattgcgc	tgttaatcac	tttactttta	1380
tctaattctag	agggtctggg	tctctttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1440
gcgggtacaa	ttccgggtgg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtgg	1500
tgtcatgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa	1560
caaaaagatt	gtctttctg	accagatgg	cgcggccacc	ctcaaaggca	tcaccgcgg	1620
ccagggtaat	atcaaattcc	cctcggtttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1680
gcccgtttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	gtttttccga	tccggtcgt	1740
gcggactcgc	tcaggtccct	cggggcgga	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgt	1800
ccaagagtac	tggaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1860
aagcttgcgt	ggtcgtctgg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcaagaatgg	1920
cctcgacccg	cggccggcccg	actgcattcg	cgtgttcgaa	ttgccccggcg	agctcgactt	1980
tcactttct	ctatcaactga	tagggagttgg	taaactcgcac	tttcactttt	ctctatcaact	2040
gatagggagt	gtttaactcg	actttcaatt	ttctctatca	ctgataggg	gtggtaaaact	2100
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	actttctct	2160
atcaactgata	gggagttggta	aactcgactt	tcactttct	ctatcaactga	tagggagttgg	2220
taaactccgac	tttcaactttt	ctctatcaact	gatagggagt	gtttaactcg	acggtcgagg	2280
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggagggccta	tataaggcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	2340
gatcgccctgg	agacgcccatt	cacgctgttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2400
cagcctccgc	ggcccccaat	tgcgaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gttaaattgc	2460
taacgcagtc	agtgcattctg	acacaacagt	ctcgaaactt	agctgcagaa	gttggcgtgt	2520
aggcactggg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaaact	2580
gggcttgcgt	aqacaqagaaa	qactcttgcg	tttctgtatag	gcacctattt	gtcttactga	

catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactccca	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtaact	taatacgaact	cactataggc	tagcctcgag	aattcacgcg	tggtagccgg	2700
ctcgatcca	ctagtaacgg	ccgcccagtgt	gctggattc	tgcagatata	catcacactg	2760
gccccgctc	gagcatgat	ctagaggggcc	ctattctata	gtgtcaccta	aatgcttagag	2820
ctcgatgtac	agcctcgact	gtgccttcta	gttgcaccc	atctgttgc	tggccctccc	2880
ccgtgccttc	cttgaccctg	gaaggtgcca	ctcccactgt	ccttcctaa	taaaatgagg	2940
aaattgcata	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattct	gggggggtggg	gtggggcagg	3000
acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	tggggatgcg	gtgggctcta	3060
tggcttctga	ggcgaaaga	accagtcac	atcgatgcta	gagttggagg	tgctgaggt	3120
cgatgagacc	cgcaccagg	gcagaccctg	cgagtgtggc	gttaaacata	ttaggaacca	3180
gcctgtgatg	ctggatgtga	ccgaggagct	gaggccccat	caattgggtc	tggccctgcac	3240
ccgcgtcgag	tttggctcta	gcatgaaaga	tacagattga	ggtactgaaa	tgtgtggcg	3300
tggcttaagg	gtggaaaga	atataaagg	tgggggtctt	atgtatgttt	gtatctgttt	3360
tgcagcagcc	gccgcccggca	tgagcaccaa	ctcggttgc	ggaagcattg	tgagctcata	3420
tttgacaacg	cgcacgtcccc	catggccgg	ggtgcgtcag	aatgtgatgg	gtcccagcat	3480
tgatggctgc	cccgctctgc	ccgcaaaactc	tactaccttgc	acctacgaga	ccgtgtctgg	3540
aaccccggtt	gagactgcag	cctccgccc	cgcttcagcc	gctcagcca	ccgcccggcg	3600
gattgtact	gactttgttt	tcctgagccc	gcttgcacagc	agtgcagtt	cccggttcatc	3660
cgcccgcat	gacaagttga	cggcttttt	gdcacaattt	gatttttgc	cccggttact	3720
taatgtcgat	tctcagcagc	tggtgatct	gcccacggcag	gtttctgccc	tgaaggcttc	3780
ctccccctccc	aatgcgggtt	aaaacataaa	taaaaaacca	gactctgttt	ggattttggat	3840
caagcaagt	tcttgctgtc	tttattttagg	ggttttgcgc	gcccggtagg	cccggttacca	3900
gcggcttcgg	tcgttgggg	tcctgtgtat	tttttccagg	acgtggtaaa	ggtgactctg	3960
gatgttcaga	tacatgggc	taagcccgtc	tctgggggtgg	agtttagcacc	actgcagagc	4020
ttcatgtcgc	gggggtgggt	tgtatgtat	ccagtcgtag	caggagcgt	ggcggtgggt	4080
cctaaaaatg	tcttcagta	gcaagctgt	tgccaggggc	aggcccttgg	tgtaagtttt	4140
tacaaagcgg	ttaagctgg	atgggtgc	acgtgggat	atgagatgc	tcttgactg	4200
tatttttag	ttggctatgt	tcctggccat	atccctccgg	ggattcatgt	tgtcagaaac	4260
caccagcac	gtgtatccgg	tgcacttggg	aaatttgc	tgtatgttt	aaggaaatgc	4320
gtggagaac	ttggagacgc	ccttgcgtacc	tccaaagattt	tccatgtcatt	cgtccataat	4380
gtggcaatg	ggccacggg	cggcgccctg	ggcgaagata	tttctggat	cactaacgtc	4440
atagttgtt	tccaggatga	gatcgtcata	ggccattttt	acaaagcgcg	ggcgagggt	4500
gccagactgc	gttataatgg	ttccatccgg	cccaggggcg	tagtaccct	cacagattt	4560
cattcccccac	gctttgagtt	cagatggggg	gatcatgtt	acctgcgggg	cgatgaagaa	4620
aacggtttcc	ggggtagggg	agatcagctg	ggaagaaagc	aggttcctg	gcagctgcga	4680
cttaccgcag	ccgggtggcc	cgttaatcac	acattttacc	gggtgcaact	ggtagttaag	4740
agagctgcag	ctggcgatcat	ccctgagcag	ggggggccact	tcgttgcata	tgtccctgac	4800
tcgcatgttt	tccctgacca	aatccgcag	aaggcgctcg	ccgcccagcg	atagcagttc	4860
ttgcaaggaa	gcaaagttt	tcaacggtt	gagaccgtcc	gccgtaggca	tgcttttgc	4920
cgtttgcacca	agcgttcca	ggcggttcca	cagtcgggtc	acctgctcta	cggtatctcg	4980
atccagcata	tcttcctcgat	tcgcgggttgc	ggggcgctt	cgctgtacgg	cagtagtcgg	5040
tgctcgatcca	gacggggccag	ggtcgttgc	ttccacgggc	gcagggtct	cgtcagcgta	5100
gtctgggtca	cgtgttgggg	gtgcgttccg	ggctgcgcgc	tggccagggt	gcgcttgcgg	5160
ctggctctgc	tgtgtcgat	gctgtccgg	tcttcgcctt	gcccgtcgcc	caggtatgc	5220
ttgaccatgg	tgtatgtat	cagcccttcc	gccccgttgc	ccttggcgcc	cagtttgc	5280
ttggaggagg	cggcgacacg	ggggcagtgc	agacttttgc	ggcgttagag	tttggcgccg	5340
agaaataccg	atccggggg	gttaggcattt	gcccgcagg	ccccgcagac	ggtctcgat	5400
tccacgagcc	aggtgatgtt	tggccgttgc	gggtcaaaaa	ccagggtttcc	cccatgttt	5460
ttgatgtcgat	tcttaccttgc	gggtttccat	agccgggtgc	cacgctcggt	gacgaaaagg	5520
ctgtccgtgt	ccccgtatac	agacttgata	ggctgttgc	cgaccgtatc	ccttgagagc	5580
cttcaaccca	gtcagcttcc	tccggggggc	ggggggcatg	actatgtcg	ccgcacttat	5640
gactgttttc	tttatcatgc	aactcgat	acaggtgcgc	gcagcgctt	gggtcatttt	5700
cgccgaggac	cgcttgcgt	ggagcgccac	gatgatcgcc	ctgtcgcttgc	cggtatttgc	5760
aatcttgcac	gccttcgttgc	aaggcttgcgt	caactggccc	gcacccat	gtttcgccga	5820
gaagcaggcc	attatcgccg	gcatggccgc	cgacgcgcgt	ggctacgtt	tgctggcggt	5880
cgcgacgcga	ggctggatgg	ccttccccat	tatgatttt	ctcgcttccg	gcggcattcg	5940
gatgcccgcg	ttgcaggcc	tgctgtccag	gcaggtagat	gacgaccatc	agggacagct	6000
tcaaggatcg	ctcgccggc	ttaccagcc	aacttcgatc	actggaccgc	tgatcgatc	6060
ggcgatttat	gccgcctcgg	cgagcacatc	gaacgggttg	gcatggattt	taggcggccgc	6120
cctatacctt	gtctgcctcc	ccgcgttgc	tgcgggtgc	tggagccggg	ccacctcgac	6180
ctgaatggaa	gccggcgcc	cctcgatc	ggattcacca	ctccaagaat	tggagccat	6240

cäattcttc	ggagaactgt	aatgcgcaa	accaaccctt	ggcagaacat	atccatcg	6300
tccgcacat	ccagcagccg	cacgcggcgc	atctcgggca	gcgttggtc	ctggccacgg	6360
gtgcgcatg	tcgtgctcct	gtcggtgagg	acccggctag	gctggcgaaa	ttgccttact	6420
ggttagcaga	atgaatcacc	gatacgcgag	cgaacgtgaa	gcgactgctg	ctgcaaaacg	6480
tctgcaccc	gagaacaac	atgaatggtc	ttcggttcc	gtgttcgt	aagtctggaa	6540
acgccaatg	cagcgccctg	caccatatg	ttccggatct	gcatcgagg	atgctgtgg	6600
ctaccctgt	gaacacctac	atctgttata	acgaagcgct	ggcattgacc	ctgagtgatt	6660
tttctctgtt	cccgccgat	ccataccgccc	agttgttac	cctcacaacg	ttccagtaac	6720
cgggcattt	catcatcagt	aacccgtatc	gtgagcatcc	tctctcg	catcggtatc	6780
attacccca	tgaacagaaaa	ttccccctta	cacggaggca	tcaagtgacc	aaacaggaaaa	6840
aaaccgcctt	taacatggcc	cgctttatca	gaagccagac	attaacgctt	ctggagaaac	6900
tcaacgagct	ggacgcggat	gaacaggcg	acatctgtg	atcgcttac	gaccacgctg	6960
atgagcttta	ccgcagctgc	ctcgccgtt	tcgggtatg	cggtaaaac	ctctgacaca	7020
tgcagctccc	ggagacggtc	acagctgtc	tgtaagcgga	tgccggagc	agacaagccc	7080
gtcaggcg	gtcagcggtt	gttggcggtt	gtcggggcgc	agccatgacc	cagtcacgta	7140
gcatagcg	agtgtatact	ggcttaacta	tgccgcata	gagcagattt	tactgagagt	7200
gcaccatatg	cggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaa	agaaaatacc	gcatcaggcg	7260
ctttccgt	tcctcgctca	ctgactcgct	gcccgttgc	gttcggctgc	ggcgagcggt	7320
atcagctcac	tcaaaggcg	taatacgg	atccacagaa	tcagggata	acgcaggaaa	7380
gaacatgtg	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaggccg	cggtgctggc	7440
gttttccat	aggctccg	cccctgacga	gatcacaaa	aatcgacgt	caagtcaag	7500
gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcg	ccccctggaa	gctccctcg	7560
gchgctcc	gttccgaccc	tgccgcttac	cgatcac	tccgccttc	tccctcggg	7620
aagcgtggcg	ctttctcaat	gctcacgct	taggtatctc	agttcggtgt	aggtcg	7680
ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaacccc	cggtcagccc	gaccgtcg	ccttatccgg	7740
taactatcg	tttgagtc	accccgtaag	acacgacta	tcgcactgg	cagcagccac	7800
tggtaacagg	attagcagag	cgaggtatgt	aggcggtgt	acagagttt	tgaagtgg	7860
gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atttggat	tgccgtctgc	tgaagccagt	7920
tacccctcg	aaaagagttt	gtagcttgc	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	7980
tggttttttt	gttgcaagc	agcagattac	gcccggaaa	aaagatctc	aagaagatcc	8040
tttgatctt	tctacgggg	ctgacgctca	gttggacgaa	aactcacgtt	aaggatttt	8100
ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatctcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	8160
taaatcaatc	taaagtat	atgataaa	ttgggtctg	agttaccaat	gcttaatcag	8220
tgaggcacct	atctcagcg	tctgttatt	tcgttcat	atagttgcct	gactccccgt	8280
cgtgtagata	actacgatac	ggggaggctt	accatctggc	cccagtgc	caatgatacc	8340
gchgagacca	cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaaggcc	8400
cgagcgcaga	agtggcctg	caacttatac	cgccctccatc	cagtcttata	attgttgcgg	8460
ggaagctaga	gtaagtatgt	cgccagttaa	tagttgcgc	aacgttgc	ccattgctgc	8520
aggcatcg	gtgtcacg	cggtgttgg	tatggcttca	ttcagctcc	gttcccaacg	8580
atcaaggcg	gttacatgt	ccccatgtt	gtgcgggggg	gcccgttag	ccttcgg	8640
tccgatcg	gtcagaagta	agttggccgc	agtgttat	ctcatgg	tggcagact	8700
gcataattct	cttactgtca	tgccatccgt	agatgttt	tctgtact	gtgagtgact	8760
aaccaagtca	ttctgagaat	agtgtatgc	gcccggagg	tgcttgc	ccggcgtca	8820
acgggataat	accgcgcac	atagcagaac	tttaaaatgt	ctcatcattt	gaaaacgtt	8880
ttcggggcga	aaactctca	ggatcttacc	gtgttgc	tccagttca	tgttaaccac	8940
tcgtgcaccc	aactgtatct	cagcatctt	tacttcacc	agcgttgc	ggtgagcaaa	9000
aacaggaagg	caaaatgccc	caaaaaagg	aataaggccg	acacggaaat	gttgaatact	9060
catactttc	cttttcaat	attattgt	catttatcg	gttattgt	tcatgagcc	9120
atacatat	aatgtat	agaaaaataa	acaaatagg	gttccgc	catttcccc	9180
aaaagtgc	cctgacgt	aagaaaccat	tattatcg	acatataact	ataaaaatag	9240
gcgtatc	aggccctt	gttcc	attcttatac	tgacatta	ctataaaaat	9300
aggcgat	cgaggcc	tcgtcat	caataatata	ccttatttt	gttgaagcc	9360
aatatgataa	tgaggggg	gagttgt	cggtggcg	ggcgtgg	cgggccgg	9420
gacgtat	gtgtgg	gtgtgtt	gcaagtgt	cgaaacacat	gtaagcgc	9480
gatgtgt	aaagtgc	tttgggt	gcccgtgt	acggaaatgt	acaattttcg	9540
cgccgtt	ggcggatgtt	gtgtaaatt	ttggcgt	caagtaatgt	ttggccattt	9600
tcgcgg	actgaaataag	aggaagt	atctgaaataa	ttctgtgtt	ctcatagcgc	9660
gtaatattt	tctagg	cgggactt	gaccgttac	gtggagact	gcccaggtgt	9720
tttctcagg	ttttccgc	gttccgg	aaagttgg	ttttattt	atagtcag	9780
ctag						9784

<210> 5  
<211> 9668  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Expressionsplasmid pShuttle.3r zur regulierten Expression nach Virusgeneration mittels AdEasy

<220>  
<221> gene  
<222> (327) .. (713)  
<223> VP16

<220>  
<221> gene  
<222> (714) .. (1352)  
<223> TetR

<220>  
<221> Intron  
<222> (1353) .. (1912)  
<223>

<220>  
<221> promoter  
<222> (1864) .. (1902)  
<223> TK-min

<220>  
<221> protein\_bind  
<222> (1913) .. (2212)  
<223> TetO7

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2213) .. (2709)  
<223> CMV-min + Intron

<220>  
<221> promoter  
<222> (2226) .. (2264)  
<223> CMV-min

<220>  
<221> multiple cloning site  
<222> (2669) .. (2770)  
<223> NheI, XhoI, KpnI, SpeI, EcoRV, NotI, XhoI

<400> 5  
ctgctgttcc ttccggcctc agaaggccata gagcccacccg catccccagc atgcctgtcta 60  
ttgtcttccc aatcctcccc cttgctgtcc tgccccaccc caccggggc aatagaatga 120  
cacctactca gacaatgcga tgcaatttcc tcattttatt aggaaaaggac agtgggagtg 180  
gcaccttcca gggtaagggc aggcacgggg gagggggcaaa caacagatgg ctggcaacta 240  
gaaggcacag tcggggctga tcagcgagct ctgcattta ggtgacacta tagaataggg 300  
ccctcttaga tcgatcctcg cgccccctac ccaccgtact cgtcaattcc aagggcacg 360  
gtaaacatct gctcaaactc gaagtggccc atatccagag cgcgttaggg ggcggagtcg 420  
tgggggttaa atcccgacc cggggaaatcc cctgtccccca acatgtccag atcgaatcg 480  
tctagcgcgt cggcatgcgc catgccacg tcctcgccgt ctaagtggag ctcgtcccc 540  
aggctgacat cggtcgggggg ggccgtcgat agtctgcgcg tgggtccgc ggggagaaag 600

gacaggcgcg	gagccgcccag	ccccgcctct	tcggggcggt	cgtcgccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtattgttt	ttcgtaacgcg	cgccgctgta	cgccgaccca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaatccg	cataatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtaataa	tggcggcata	840
ctatcagtag	tagtgtttc	ccttcttct	ttagcgactt	gatgcttgc	atcttccat	900
acgcaaccta	aagtaaaaatg	ccccacacgcg	ctgagtgcata	ataacgcgtt	ctctagtgaa	960
aaaccttgtt	ggcataaaaaa	ggcttaattga	ttttcgagag	tttcataactg	tttttctgtta	1020
ggccgtgtat	ctgaatgtac	ttttgttcca	ttgcgatgac	tttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattgcgtaa	aaaatcttgc	cagtttccc	cttttaaagg	gcaaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaacat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaaagccc	cttattttt	1200
acatgcataat	acagtgttagg	ctgcttaca	ccaagttct	ggggaggttt	acgggttgg	1260
aaaccttcga	ttccgaccc	attaagcagc	tctaatgcgc	tgttaatcac	tttactttt	1320
tctaatctag	agggtctggg	tctcttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gccccgtacaa	ttccgggttgg	acctggag	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtgg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagccgt	ccacaccta	agcttgacaa	1500
aaaaaagatt	gtctttctg	accagatgga	cgcggccacc	ctaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatacct	cctcggtttt	gaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcata	1620
gccccgttt	gagagggagt	actcaccctt	acagtcgaga	ggtttccga	tccggtcgtat	1680
gccccgtcg	tcaggtccct	cggtggcgga	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtagc	tggaaagacc	gcaagagtt	tgtctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgcgt	ggtcgctcg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	acctaataat	gcaagtgga	1860
cctcgaccc	cgccgcccc	actgcatactg	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaaactcgtac	tttactttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	ggtaaaactcg	actttactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgacttcc	actttctct	2100
atcaactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaaactcgac	tttactttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggaggccta	tataaggcaga	gctcggttag	tgaaccgtca	2280
gatcgccctgg	agacgcatac	cacgctgttt	tgacccatcat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaat	tgcgaagctt	tattgcgtta	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgttctg	acacaacagt	ctcgaactt	agctgcagaa	gttggtcgt	2460
aggcacttgg	caggttaagta	tcaagttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgcgt	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattt	gtcttactga	2580
catccactt	gcctttctct	ccacagggtt	ccactccat	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtagt	taatacgtact	cactataaggc	tagcctcgag	aattcacgcg	tggttaccgag	2700
ctcgatcca	ctagtaacgg	ccgcaactgt	gctggaaattt	tgcagatatc	catcacactg	2760
gccccgcgtc	gagcatgcat	ctagagggcc	ctattctata	gtgtcaccta	aatgttagag	2820
ctcgctgatc	agcctcgact	gtgccttctt	gttgcagcc	atctgttgg	tgccccctccc	2880
ccgtgccttc	cttgaccctg	gaaggtgcca	ctccccactgt	ccttcctaa	taaaatgagg	2940
aaattgcata	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattt	gggggggtggg	gtggggcagg	3000
acagcaagggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	tggggatgcg	gtggggctcta	3060
tggcttctga	ggcggaaaga	accagtcgac	tgcagatct	gggcgtggg	aagggtggga	3120
aagaatataat	aaggtggggg	tcttatgttag	ttttgtatct	gttttgcagc	agccgcggcc	3180
gccatgagca	ccaaactcggt	tgatgaaagc	attgtgagct	catatttgc	aacgcgcata	3240
cccccatggg	ccgggggtgcg	tcagaatgtg	atgggcttca	gcattgatgg	tcgccccgtc	3300
ctgcccgcac	actctactac	cttgacactt	gagaccgtgt	ctggAACGCC	gttggagact	3360
gcagcctccg	ccggccgttc	agccgctgca	gccaccgccc	gcccgttgt	gactgactt	3420
gttttcttgc	gcccgttgc	aagcaatgc	gttcccgtt	catcccccgg	cgatgacaag	3480
ttgacggctc	ttttggcaca	attggattct	ttgacccggg	aacttaatgt	cgtttctcag	3540
cagctgttgg	atctgcgcca	gcagggttct	gcctgaagg	tttcttcccc	tcccaatgcg	3600
gtttaaaaca	taaataaaaaa	accagactt	gtttggattt	ggatcaagca	agtgttgc	3660
tgtcttattt	taggggtttt	gcccgcgcgg	tagccccggg	accagcggtc	tcgggtcg	3720
agggtctctgt	gtattttttc	caggacgtgg	taaagggtgac	tctggatgtt	cagatacatg	3780
ggcataagcc	cgtctctggg	gtggaggtag	caccactgca	gagtttcatg	ctgcgggtg	3840
gtgttgcata	tgatccagtc	gtacgaggag	cgctgggcgt	ggtgcctaaa	aatgttcc	3900
agtagcaagc	tgattgcccag	gggcaggccc	ttgggtgtaa	tggttacaaa	gcccgttaagc	3960
tgggtatgggt	gcatacgtgg	ggatatgaga	tgcatttgg	actgtatttt	taggttggt	4020
atgttcccag	ccatatccct	ccggggattt	atgttgcga	gaaccaccag	cacagtgtat	4080
ccgggtcact	tggaaattt	gtcatgttagc	ttagaaggaa	atgcgtggaa	gaacttggag	4140
acgcccctgt	gacctccaag	atttccatg	cattcgtcca	taatgtatgc	aatggccca	4200
cgggcgccgg	cctggcgca	gatatttctg	ggatcactaa	cgtcatagtt	gtgttccagg	4260

atgagatcg	cataggccat	ttttacaaag	cgcggccgga	gggtgccaga	ctgcggtata	4320
atggttccat	ccggccccagg	ggcgtagtt	ccctcacaga	tttgcatttc	ccacgccttg	4380
atgtcagatg	gggggatcat	gtctacactgc	ggggcgatga	agaaaacgg	ttccgggtt	4440
ggggagatca	gctggaaaga	aagcaggttc	ctgagcagct	gcgacttacc	gcagccgg	4500
ggcccgtaaa	tcacacctat	taccgggtgc	aactggtagt	taagagagct	gcagctgccc	4560
tcatccctga	gcaggggggc	cacttcgtta	agcatgtccc	tgactcgcat	gtttccctg	4620
accaaatccg	ccagaaggcg	ctcgccgccc	agcgatagca	gttcttgc	ggaagcaag	4680
ttttcaacg	gtttgagacc	gtccggcgta	ggcatgttt	tgagcgttt	accaagcagt	4740
tccaggcggt	cccacagctc	ggtcacactgc	tctacggcat	ctcgatccag	cataatctcct	4800
cgtttcgccc	gttggggcg	cttcgtgt	acggcagtag	tcgggtctcg	tccagacgg	4860
ccagggtcat	gtctttccac	gggcgcaggg	tcctcgta	cgtagtctgg	gtcacgg	4920
aggggtgcgc	tccgggctgc	gwgctggcca	gggtgcgc	gaggctgg	ctgctgg	4980
tgaagcgctg	ccggcttc	ccctgcgcgt	cgccaggt	gcatttgc	atgggtgtcat	5040
agtccagccc	ctccgcggcg	tggcccttgg	cgcgagctt	gcccttggag	gaggcgccgc	5100
acgaggggca	gtgcagactt	ttgaggcg	agagcttgg	cgcgagaaat	accgattccg	5160
gggagtaggc	atccgcgc	caggccccgc	agacggcttc	gcattccacg	agccaggtga	5220
gctctggccg	ttcggggtca	aaaaccagg	ttccccatg	cttttgc	cgtttcttac	5280
ctctggttc	catgagccg	tgtccacgt	cggtgacgaa	aaggctgtcc	gtgtccccgt	5340
atacagactt	gagagggagt	ttaaacgaat	tcaatagctt	gttgcattgg	cgccgatata	5400
aaatgcaagg	tgctgctcaa	aaaatcaggc	aaagcctc	gcaaaaaaaga	aagcacatcg	5460
tagtcatgct	catgcagata	aaggcaggta	agctccggaa	ccaccacaga	aaaagacacc	5520
attttctct	caaacatgtc	tgcgggtt	tgcataaaaca	aaaaataaaa	taacaaaaaa	5580
acatttaaac	attagaagcc	tgtcttacaa	cagaaaaaa	aacccttata	agcataagac	5640
ggactacggc	catgcccggc	tgaccgtaaa	aaaactggc	accgtgatta	aaaagcacca	5700
ccgacagctc	ctcggtcat	tccggagtca	taatgtaa	ctcggtaaac	acatcagg	5760
gattcatcg	tcagtgt	aaagcgacc	aaatagccg	ggggatata	tacccgcagg	5820
cgtagagaca	acattacgc	ccccatagga	ggtataacaa	aattaatagg	agagaaaaac	5880
acataaaacac	ctgaaaaacc	ctccgccta	ggcaaaatag	caccctcccg	ctccagaaca	5940
acatacagcg	cttcacagcg	gcagccta	agtcagcc	accgtaaaa	aagaaaaac	6000
ataaaaaaa	caccactcg	cacggcacca	gctcaatcg	tcacagtgt	aaaaagg	6060
aagtgcagag	cgagtata	taggactaa	aaatgacgt	acggtt	tccaca	6120
acacccagaa	aaccgcacgc	gaacctacgc	ccagaaacga	aagccaaaa	acccacaact	6180
tcctcaaaatc	gtcacttccg	tttcccacg	ttacgtact	tccat	agaaaaactac	6240
aattcccaac	acataca	tactccgccc	taaaacctac	gtcaccgc	cggttcc	6300
gccccgcg	acgtcaca	ctccaccc	tcattatcat	attggctt	atccaaaata	6360
aggtatatta	ttgatgtatgt	taattaacat	gcatggatcc	atatgcgt	tgaaataccg	6420
cacagatgcg	taaggagaa	ataccgc	aggcgctt	ccgcttcc	gctcactg	6480
tcgctgcg	cgtcg	gctcgccg	gcccgtatcg	ctcact	ggcgtaata	6540
cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgc	gaaaagaca	tgtgagca	aggccag	6600
aaggccagga	accgtaaaa	ggccgcgtt	ctggcg	tccatagg	ccgcccc	6660
gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctca	cagagg	gaaacccg	aggactata	6720
agataccagg	cgttcccc	tggaagctt	ctcgtcg	ctctgtt	gaccctgc	6780
cttaccggat	acctgtccg	tttcc	tcgggaag	tggcg	tcatag	6840
cgctgttagt	atctcgtt	ggtgt	tttgc	agctgg	tgtgcac	6900
ccccccgtt	agcccgacc	ctgcgc	tccggta	atcgtt	gtccaa	6960
gtaagacacg	acttatcg	actggc	gccactgg	acaggatt	cagacg	7020
tatgttagcg	gtgctacaga	gttctt	tggtgg	actacgg	cactaga	7080
acagtatttgc	gtatctgc	tctgt	ccagtt	tgaggatt	atgtgt	7140
tcttgc	gcaaaacaa	caccgt	agcggt	ttttt	caagc	7200
attacgc	aaaaaaagg	atctaa	gatc	tcttct	gggtct	7260
gctcgtt	acgaaaactc	acgtt	atttgg	tgaggatt	aaaaagg	7320
ttcacctaga	tccttt	taaaaaat	agttt	caatctaa	tatata	7380
taaacttgg	ctgac	ccaat	atcgt	gagg	cac	7440
ctat	catccat	agt	cccgt	agataact	gatacgg	7500
ggcttacat	ctggcccc	tgct	cccg	accacg	accgg	7560
gat	caataa	cc	cgag	acc	cc	7620
ttatccgc	ccatcc	gtt	cgac	acc	cc	7680
gttaatagg	tgc	ttt	ccatt	tgag	ttc	7740
ttcacctaga	tcctt	ca	ggcca	ttg	ccat	7800
aatgtcagct	actgg	ttt	ggc	gatt	gg	7860
gcttgc	actgg	ttt	ggc	aaaa	gg	7920
actgtccat	atgtccat	gtc	ggc	gg	gg	

ccggaattgc cagctgggc gccctctggt aaggttgggaa agccctgcaa agtaaactgg	7980
atggcttct cgccgccaag gatctgatgg cgcaaggat caagctctga tcaagagaca	8040
ggatgaggat cgtttgcgt gattgaacaa gatggattgc acgcaggatc tccggccgt	8100
tgggtggaga ggcttattcg gatgactgg gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc	8160
gccgtgttcc ggctgtcgc gcagggcgc cccgttctt ttgtcaagac cgacctgtcc	8220
ggtgccctga atgaactgca agacgaggca ggcggctat cgtggctgg cacgacggc	8280
gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgc actgaagcgga aagggactg gctgctattg	8340
ggcgaagtgc cggggcagga ttcctgtca ttcaccttgc tccctgccc gaaagtatcc	8400
atcatggctg atgcaatgcg gggctgcgt acgcttgc acgcgttgc cccattcgac	8460
caccaaggca aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggagccgg tcttgcgtat	8520
caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctcgcggccag ccgaactgtt cgccaggctc	8580
aaggcgagca tgcccgcacgg cgaggatctc gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgcgg	8640
aatatcatgg tggaaaatgg ccgcatttttgc gattcatcg actgtggccg gctgggtgt	8700
gcccggccgt atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgtcaaga gcttggccgc	8760
aatatggccgttccct cgtgttttac ggtatcgccg ctcccgatttgc gcaagcgatc	8820
gccttctatc gccttcttgc cgagtttttgc tgaatttttgc taaaattttt gttaaatcag	8880
ctcatttttta aaccaatagg ccgaaatcggtt caacatccct tataaatcaa aagaataagac	8940
cgcgataggg tttagtgcgttgc ttccagtttgc gacaagagt ccactattaa agaacgtgg	9000
ctccaaacgtc aaaggcgaa aaaccgtcta tcaggcgat gcccactac gtgaaccatc	9060
acccaaatca agtttttgc ggtcgagggtg ccgtaaagct ctaaatcggtt accctaaagg	9120
gagcccccgatgg ttttagtgcgttgc gacggggaaa gcccggcaac gtggcgagaa aggaaggaa	9180
gaaagcgaaa ggagcgccgcg ctaggcgcttgc gcaagtgta ggggtcacgc tgccgttaac	9240
caccacaccc ggcgcgtttaa tgccgcgttgc cagggcgcttgc ccattcgcca ttccaggatcg	9300
ataatatttta taagtttttgc taacatcatc aataatatac cttattttgc attgaagcca	9360
atatgataat gagggggtgg agtttgcgttgc gtggcgccgg gctggggaaac ggggcgggtg	9420
acgttagtgcgttgc gtcgttgcgttgc caagtgttgc ggaacacatg taagcgacgg	9480
atgtggcaaaa agtgacgttt ttgggtgtcgcc cccgtgtaca caggaagtga caattttgc	9540
gcgggttttag gcccgttgcgttgc tagtaaattt gggcgtaacc gagtaagatt tggccatttt	9600
cgccggaaaaa ctgaataaga ggaagtggaa tctgaataat ttgtgttac tcatagcg	9660
taataactg	9668

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**